Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Das gelchromatographische Verhalten der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes untersucht an den Sephadex — Gelen G 100 und G 200

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

INGEBORG SIEWERS

1969

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter

I. Referent: Privatdozent Dr. med. W. Leppla

II. Referent: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Das gelchromatographische Verhalten der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes untersucht an den Sephadex — Gelen G 100 und G 200

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

INGEBORG SIEWERS

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter

I. Referent: Privatdozent Dr. med. W. Leppla

II. Referent: Prof. Dr. med. F. Doenecke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6. Februar 1969 abgelegt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A EINLEITUNG S. 1

B PROBLEMSTELLUNG S. 9

C THEORETISCHER TEIL S. 11

a) Die Struktur des Gels S. 13
b) Die Theorie der Gelfiltration S. 19
c) Theorien zur Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelchromatographie S. 23

D EXPERIMENTELLER TEIL

a) Die Bestimmungsmethode der Proteinkonzentration und der proteolytischen Aktivität S. 57
b) Die Aufbereitung des Gels und die Beschickung der Säule S. 68
c) Die Gelchromatographietechnik S. 69
d) Das Aufgeben der Probe auf die Säule S. 73
e) Die Eichung der Säule S. 74
f) Die Aufbereitung des Magensaftes und des Harnes S. 85
g) Die experimentellen Ergebnisse der Gelchromatographie des Magensaftes und des Harnproteinkonzentrates S. 86
h) Original-Auto-Analyzer-Messung S. 99
i) Die Ermittlung der Molekulargewichte des Magenpepsins und des Uropepsinogens aus den gemessenen Auslaufmengen und die Berechnungen ihrer mittleren Molekulargewichte S.101

E DISKUSSION S. 105

F ZUSAMMENFASSUNG S. 110

G LITERATURVERZEICHNIS S. 112

A EINLEITUNG

Eine saure Protease des menschlichen Harnes wurde von v. BRÜCKE (1) im Jahre 1861 entdeckt. Sie wurde später als " Uropepsin " bezeichnet, ein Hinweis, daß sie aus den Hauptzellen der Magenschleimhaut stammt (2). Diese von BENDERSKY geprägte Bezeichnung ist noch heute in der angelsächsischen Literatur üblich. In der deutschen Literatur bezeichnet man die im Urin ausgeschiedene Enzymvorstufe als " Uropepsinogen ".

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Physiologie und der klinischen Bedeutung des Uropepsinogens gingen sämtlich von der Annahme aus, daß das Uropepsinogen ein einheitliches Protein sei. Diese Annahme konnte durch Chromatographie des Uropepsinogens an hydrophilen Ionenaustauschern (z.B. DEAE - Cellulose und DEAE - Sephadex) geprüft werden. SEIJFFERS et al. (3) und LEPPLA et al. (4) konnten die Heterogenität des im menschlichen Harn ausgeschiedenen Uropepsinogens beweisen. In beiden Untersuchungen wurde gezeigt, daß Uropepsinogen sich in mindestens drei Proenzymfraktionen zerlegen läßt.

Da das Uropepsinogen sich von dem in den Hauptzellen des Magens produzierten Pepsinogen ableitet, lag es nahe, das chromatographische Verhalten des in der Magenschleimhaut enthaltenen Proenzyms mit dem des Uropepsinogens zu vergleichen. Eine entsprechende Untersuchung wurde von SEIJFFERS et al. (5) durchgeführt. In den Abbildungen 1 und 2 wird das Ergebnis zweier chromatographischer Untersuchungen wiedergegeben, die der Arbeit von SEIJFFERS et al. (5) entnommen sind.

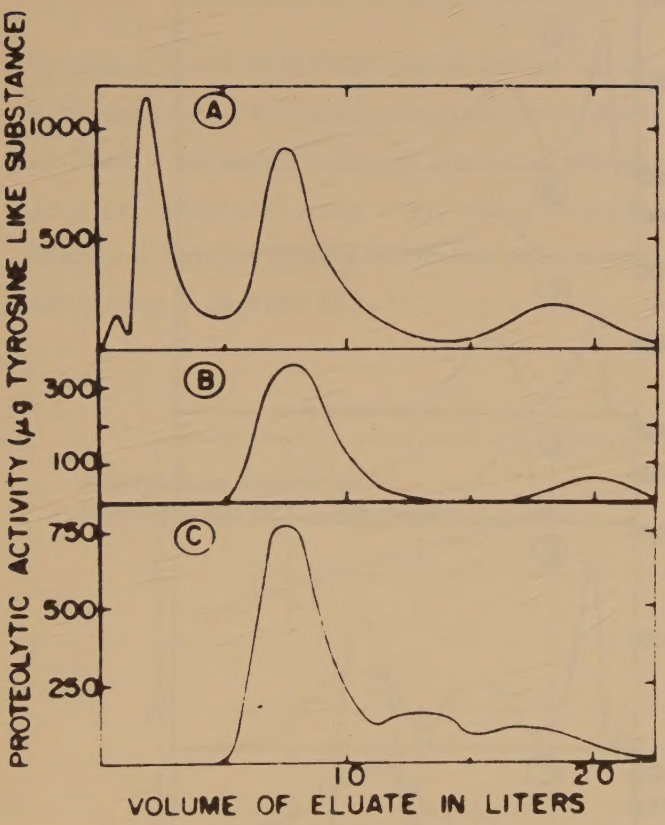

Abb. 1: Vergleichende chromatographische Untersuchungen der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes und des Magensaftes

A: Magensaft Pat. V (Duodenalulcus)
B: Urin Pat. V (Duodenalulcus)
C: Urin eines gesunden Probanden (SEIJFFERS et al.)

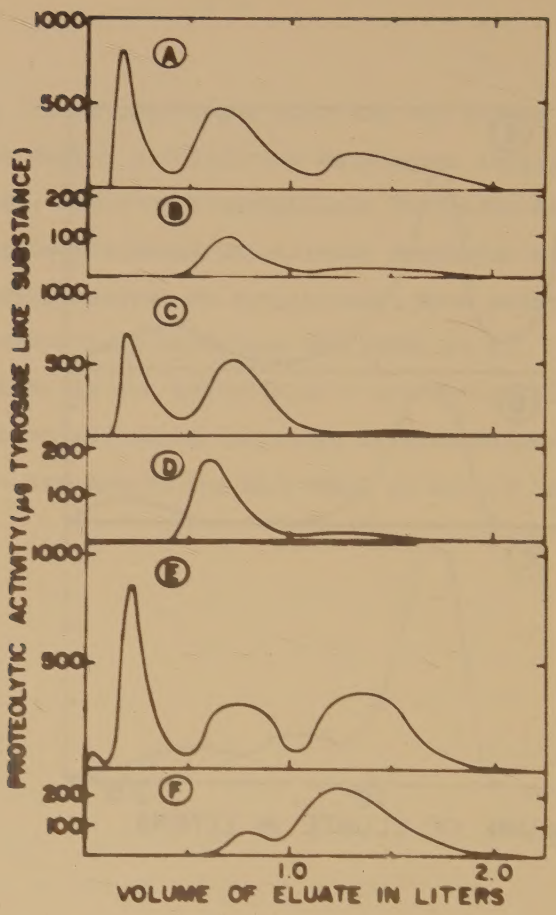

Abb. 2: Chromatographische Untersuchungen der sauren proteolytischen Aktivität des Magensaftes und Urins von Patienten mit peptischem Magengeschwür

A: Magensaft Pat. I B: Urin Pat. I
C: Magensaft Pat. III D: Urin Pat. III
E: Magensaft Pat. IV F: Urin Pat. IV
(SELJFFERS et al.)

Unabhängig von SEIJFFERS haben LEPPLA et al. (6) die Heterogenität des Uropepsinogens durch Gradientenelution an DEAE - Sephadex bewiesen. Eine repräsentative Darstellung der Fraktionierung eines durch Ultrafiltration gewonnenen Harnproteinkonzentrates ist in der folgenden Abbildung 3 gegeben (6).

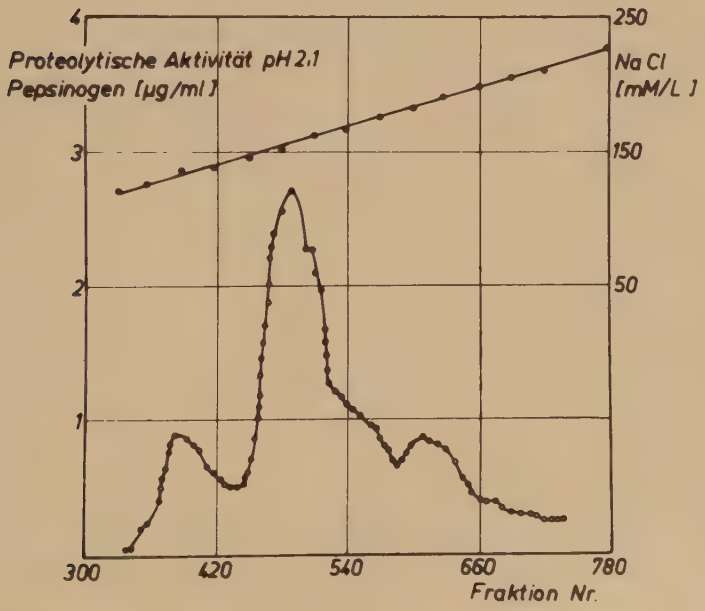

Abb. 3: Eine repräsentative Fraktionierung der sauren proteolytischen Aktivität eines Harnproteinkonzentrates (LEPPLA et al.)

Auf Grund der Untersuchungen beider Arbeitsgruppen ist es somit erwiesen, daß menschliches Uropepsinogen gesunder Probanden nicht einheitlich ist und aus mindestens drei Komponenten besteht.

Untersuchungen, die zum Ziele haben, die molekulare Größe oder das Molekulargewicht des menschlichen Uropepsinogens oder Uropepsins zu ermitteln, liegen bis jetzt nicht vor. WAGNER (7) versuchte, mit Hilfe von Ultracellamembranen verschiedener Porengröße den Bereich abzuschätzen, in dem das Molekulargewicht des Uropepsinogens liegt. Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Aktivität im Filtrat und im Rückstand für Membranen, die das Proenzym zum Teil oder vollständig zurückhielten.

Tabelle 1: Die Verteilung des Uropepsinogens bei Ultrafiltrationsversuchen an Membranen verschiedener Porengröße (WAGNER)

VP. ♀ Nr. ♂	24-Std. Harnmenge (ml)	Ultracella 20 - 35 mu UP.E/h FR Filtr.	Ultracella 10 - 20 mμ UP.E/h FR Filtr.	Ultracella 5 - 10 mμ UP.E/h FR Filtr.	Ultracella < 5 mμ UP.E/h FR Filtr.	Cellophan (0,03mm) < 5 mμ UP.E/h FR Filtr.	Cellophan (0,02mm) < 5 mμ UP.E/h FR Filtr.	Kontrolle ohne Filtr. UP.E/h
1	1830	Ø 07,4	Ø 7,o	2,3 5,6	6,9 Ø	7,7 Ø	7,9 Ø	7,6
2	1600	Ø 11,o	Ø 10,5	4,5 7,o	10,1 Ø	10,0 Ø	9,8 Ø	10,4
3	1480	Ø 19,7	Ø 17,6	6,2 11,7	17,9 Ø	17,8 Ø	18,0 Ø	18,4
4	1440	Ø 13,1	Ø 12,4	5,2 7,8	11,9 Ø	12,4 Ø	12,7 Ø	13,0
5	1950	Ø 54,4	Ø 55,8	19,9 33,2	56,0 Ø	53,9 Ø	55,5 Ø	56,4
6	1560	Ø 58,2	Ø 59,2	26,o 26,2	56,9 Ø	57,6 Ø	59,o Ø	58,5
7	1890	Ø 21,4	Ø 22,o	6.8 14,6	21,8 Ø	21,3 Ø	22,7 Ø	22,5
8	1140	Ø 8,5	Ø 8,o	3,4 6,1	7,9 Ø	8,3 Ø	8,1 Ø	8,3
9	1080	Ø 22,o	Ø 23,1	8.o 11,7	22,5 Ø	23,5 Ø	22,3 Ø	23,4
10	1080	Ø 28,2	Ø 27,9	10,3 17,3	29,6 Ø	28,7 Ø	30,1 Ø	29,6
11	1090	Ø 30,3	Ø 29,7	9,9 21,9	28,8 Ø	30,5 Ø	30,9 Ø	31,2
12	1000	Ø 10,6	Ø 10,4	4,1 7,2	11,5 Ø	10,9 Ø	11,8 Ø	11,6
13	1140	Ø 15,8	Ø 14,9	4,7 10,1	14,7 Ø	15,o Ø	16,o Ø	16,7
14	1120	Ø 32,7	Ø 32,3	8,6 22,3	31,4 Ø	31,8 Ø	32,2 Ø	33,8
15	1400	Ø 14,5	Ø 14,6	5,8 8,7	14,3 Ø	15,1 Ø	14,9 Ø	16,2
16	1370	Ø 11,9	Ø 12,1	2,9 7,9	11,6 Ø	12,2 Ø	13,2 Ø	12,6
17	1210	Ø 16,o	Ø 15,5	5,3 9,4	14,8 Ø	15,1 Ø	14,8 Ø	16,3
18	1340	Ø 20,4	Ø 19,2	7,4 11,9	21,1 Ø	20,0 Ø	20,4 Ø	21,o
19	1000	Ø 14,3	Ø 14,7	6,4 8,7	14,2 Ø	14,7 Ø	15,o Ø	15,9
20	1370	Ø 10,2	Ø 10,o	2,8 7,2	9,7 Ø	10,o Ø	10,4 Ø	11,o
21	1050	Ø 32,4	Ø 32,8	9,2 21.8	33,o Ø	32,3 Ø	33,6 Ø	34,2
22	1000	Ø 18,5	Ø 18,9	4.3 15,o	19,4 Ø	21,o Ø	20,3 Ø	20,1
23	1110	Ø 20,1	Ø 20,6	3,9 16,7	21,5 Ø	20,2 Ø	21,2 Ø	22,o
24	1670	Ø 15,5	Ø 14,7	6,1 8,9	14,8 Ø	15,o Ø	15,9 Ø	16,4
25	1000	Ø 16,6	Ø 15,9	4,o 10,9	16,2 Ø	16,7 Ø	17,o Ø	17,4

Die Tabelle 1 zeigt, daß das Uropepsinogen-Molekül eine Filtermembran mit einem mittleren Porendurchmesser zwischen 10 - 35 mμ uneingeschränkt passieren kann. Die Ultrafiltrate jedoch, welche Filter mit Porenweite < 5 mμ passieren, sind uropepsinogenfrei; die gesamte Uropepsinogenmenge ist im Filterrückstand (FR) nachweisbar.

Die Filtermembran mit einem mittleren Porendurchmesser 5 - 10 mμ (Ultracella "feinst") läßt einen Großteil des Uropepsinogens passieren. Es ist im Filtrat wiederzufinden. Der kleinere Anteil wird von der Membran zurückgehalten und ist im Filterrückstand nachweisbar; d.h. der Größe des Uropepsinogen-Moleküls ist eine Porenweite von wenig mehr als 5 mμ angemessen. Das Uropepsinogen-Molekül muß also im Größenordnungsbereich über 30 000 (bei 40 000) liegen, da die Filtermembran (Ultracella feinst) Eiweiße von Molekulargewichten > 30 000 abtrennt.

B PROBLEMSTELLUNG

Der Versuch, Molekulargewichte auf Grund der Permeation durch Membranen bekannter Porengröße abzuschätzen, wie er von WAGNER für das menschliche Uropepsinogen unternommen wurde, konnte nur zu einem Ergebnis führen, das orientierenden Charakter hat.

Eine neue Möglichkeit, das Molekulargewicht von globulären Proteinen enger einzugrenzen, ist durch die Anwendung der molekularen Siebung an Gelen gegeben. Hierzu werden vor allem die Sephadex - Gele verwendet. Das Auflösungsvermögen der Gelchromatographie ist allerdings begrenzt, und Proteine mit ähnlicher molekularer Größe werden sich im Gelchromatogramm nur wenig in der Lage ihrer Elutionsmaxima unterscheiden. In Proteingemischen ist zur Erfassung der Elutionsmaxima einzelner Proteine neben der Eiweißbestimmung im Eluat ein für das zu bestimmende Protein spezifischer Nachweis erforderlich. Bei der Untersuchung von Enzymen wäre dies ein entsprechender Aktivitätstest.

In der vorliegenden Arbeit soll das Verhalten des menschlichen Uropepsinogens an den Gelen Sephadex G 200 und G 100 untersucht und durch Vergleich mit dem Verhalten von Testproteinen eine möglichst enge Eingrenzung des Molekulargewichtes vorgenommen werden.

Da das menschliche Uropepsinogen zusammen mit den anderen physiologischen im Harn ausgeschiedenen Proteinen vorliegt, müssen bei dieser Untersuchung Eiweißkonzentration und Enzymaktivität im Eluat gleichzeitig bestimmt werden.

C THEORETISCHER TEIL

Die Ermittlung von Molekülverteilungen ist eine klassische Aufgabe der makromolekularen Chemie. Im einfachsten Falle sind die zu unterscheidenden Systeme polymer homolog. Die Moleküle haben dann die gleiche Gestalt, unterscheiden sich aber durch das Molekulargewicht. Ein solcher Fall ist zum Beispiel bei Polystyrol gegeben.

Durch die Angabe einer Verteilungsfunktion

$$n_p = h\,(P) \qquad 1$$

n_p = die Anzahl der Moleküle mit dem Polymerisationsgrad P pro g Polymeres

P = Polymerisationsgrad

h = Funktion

ist ein solches System charakterisiert (8).

Die Frage nach einer Verteilungsfunktion kann auch prinzipiell für Gemische von Eiweißmolekülen gestellt werden, z.B. für das Humanserum. Hier handelt es sich um eine Eiweißverteilung mit drei Hauptfraktionen, die den Molekulargewichtsbereichen über 200 000 (erste Hauptfraktion), um 150 000 (zweite Hauptfraktion) und um 70 000 (dritte Hauptfraktion) entsprechen (9). Dabei trifft man allerdings auf eine komplizierte Problematik, weil sich die Eiweißmoleküle nicht nur in ihrem Molekulargewicht, sondern auch in ihrer Form und in ihrer Ladung unterscheiden.

Neben den klassischen Fraktionierungsverfahren, wie sie in der folgenden Tabelle kurz charakterisiert werden, hat die Anwendung molekularer Siebverfahren neue Möglichkeiten der Ermittlung von Eiweißverteilungen bzw. der Abschätzung von Molekulargewichten einzelner Eiweiß-Individuen ergeben.

Methode	Das physiko-chemische Prinzip, das zur Zerlegung in einzelne Fraktionen führt
Aussalzmethoden z.B. $(NH_4)_2\ SO_4$	Löslichkeit
Ultrazentrifuge	Sedimentationsgeschwindigkeit
Elektrophorese	Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld
Ionenaustauscher	Oberflächenladungsdichte

Tabelle 2: Bisherige Methoden der Fraktionierung von Eiweißgemischen und das ihr zugrunde liegende physiko-chemische Prinzip

a) Die Struktur des Gels

Im Folgenden soll auf die Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten der molekularen Siebverfahren (Gelfiltration und Gelchromatographie) eingegangen werden. Zum Verständnis ist es nötig, die Struktur der molekularen Siebe zu diskutieren. Diese Betrachtung wird am Beispiel der Dextran-Gele durchgeführt.

Der Aufbau der Dextran-Gele läßt sich aus ihren Herstellungsbedingungen in einfacher Weise erläutern: Die Dextranmoleküle, die zur Vernetzung gebracht werden, liegen in Lösung als statistische Knäuel vor, deren Monomereneinheit die Glukose ist. Das Verknüpfungsprinzip ist die α_{1-6} - glykosidische Bindung. Die Dextranketten werden mit Epoxyden bzw. mit Epichlorhydrin zur Vernetzung gebracht.

Die folgenden Gleichungen geben die Wirkungsweise des bifunktionellen Epichlorhydrins mit Alkoholen wieder. Man kann annehmen, daß diese Verknüpfungsreaktion auch an den sekundären Alkoholgruppen der Dextranketten in gleicher Weise abläuft.

$$R\text{-}OH + CH_2\text{-}CH\text{-}CH_2Cl \xrightarrow{(OH)^-} R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2Cl \qquad 2$$

$$R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2Cl + NaOH \longrightarrow R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH\text{-}CH_2 + NaCl + H_2O \qquad 3$$

$$R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH\text{-}CH_2 + HO\text{-}R_1 \longrightarrow R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}R_1 \qquad 4$$

Die ist der von FLODIN (10) angegebene Mechanismus zur Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes. Epichlorhydrin reagiert mit den sekundären Alkoholgruppen des Dextrans und bildet Glycerylbrücken.

Bei einer genügend hohen Konzentration der Dextranketten in Lösung werden also zwischen den einzelnen Dextranketten Brücken gebildet. Die entstehenden Bindungen sind kovalent. Eine Nebenreaktion der Vernetzung, die zu erwarten ist, ist das Auftreten von unechten "Verknüpfungen". Sie beruhen darauf, daß sich z.B. zwei Fadenmoleküle gegeneinander "verschlaufen" können. Diese unechte "Verknüpfung" kann durch die Vernetzungsreaktion fixiert werden, indem zwischen den beiden Schenkeln eines Fadenmoleküls eine Brücke geschlagen wird.

Da die Vernetzungsreaktion ohne eine räumliche Orientierung verläuft, entsteht auf diese Weise ein dreidimensionales Netzwerk von Dextranketten mit statistisch verteilten Verknüpfungspunkten. Dieses Netzwerk hat die Eigenschaften eines Xerogels. Eine Charakterisierungsmöglichkeit eines solchen Netzwerks ist durch die Dichteverteilung der Monomeren im Gel gegeben; man benutzt den Parameter der Monomerendichte (10). Darunter versteht man die Anzahl der Monomeren in der Kette, die auf eine Volumeneinheit des gequollenen Gels entfällt. Demnach ist zu erwarten, daß in den Bereichen der echten Verknüpfungen und der unechten "Verknüpfungen" Bezirke erhöhter Monomerendichte entstehen, während dazwischen Bezirke niedrigerer Monomerendichte liegen.

Das makroskopische Verhalten der Gele läßt sich zwanglos aus dem Modell des dreidimensionalen Netzwerks ableiten. So ist z.B. zu erwarten, daß mit steigendem Vernetzungsgrad die in gequollenem Zustand aufgenommene Wassermenge geringer wird. Die folgende Tabelle 3 zeigt diese Abhängigkeit der Wasseraufnahme vom Vernetzungsgrad für die Gele Sephadex G 10 bis G 200.

Sephadex-Typ	Wasseraufnahme ml/g trockenes Sephadex
G 10	1,0 ± 0,1
G 15	1,5 ± 0,2
G 25	2,5 ± 0,2
G 50	5,0 ± 0,3
G 75	7,5 ± 0,5
G 100	10,0 ± 1,0
G 150	15,0 ± 1,5
G 200	20,0 ± 2,5

Tabelle 3: Die Wasseraufnahme (water regain) der einzelnen Sephadex-Gel-Typen

Auf Grund der Tatsache, daß die Dextranketten keine starren Stäbchen sind, werden sich durch die Brown'sche Molekularbewegung die Abstände der einzelnen Polymerketten voneinander in jedem Zeitmoment ändern. Im zeitlichen Mittel jedoch ist eine Konstanz der Abstände zu erwarten; je geringer die Zahl der Verknüpfungspunkte pro Volumeneinheit des gequollenen Gels ist, desto größer wird der Anteil des aufgenommenen Lösungsmittels.

Eine Darstellung der oben diskutierten molekularen Struktur des Dextran-Gels ist in der folgenden Abbildung 4 wiedergegeben:

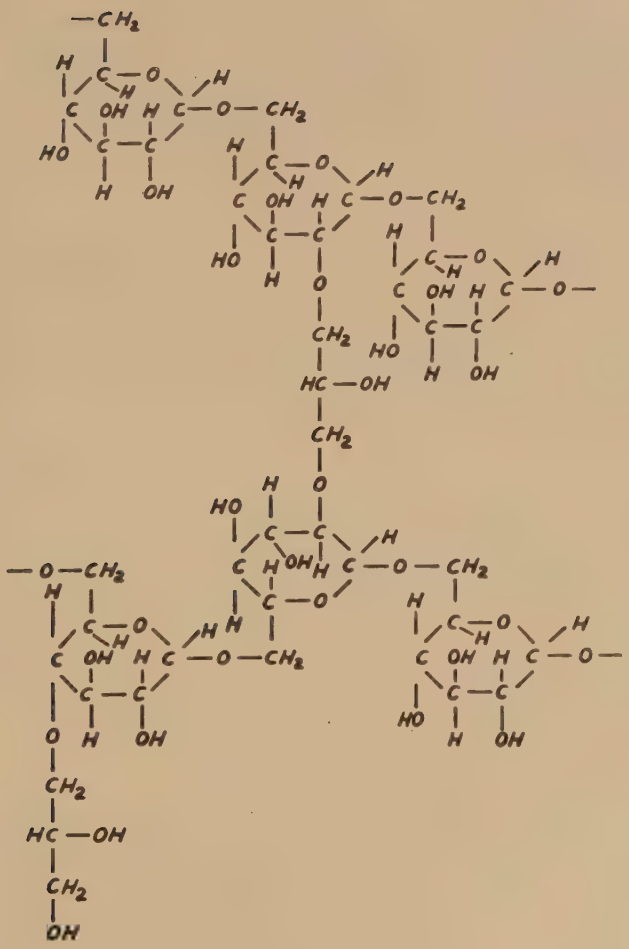

Abbildung 4

Die Struktur des Dextrangels
Die Verknüpfungsstellen zwischen zwei Dextranketten sind durch "Glyceryl"-Brücken gegeben.

Die Dextran-Gele zeichnen sich weiter durch folgende physiko-chemische Eigenschaften aus:

1) Sie quellen nicht nur in Wasser, sondern auch in Dimethylsulfoxyd, Formamid, Glykol und wäßrigen Mischungen von niederen Alkoholen. Das gilt für alle Typen der Sephadex-G-Serie; für die Typen Sephadex G 10 und G 15 ist auch Dimethylformamid als Quellungsmittel brauchbar.

2) Vorteilhaft ist die chemische Stabilität der Sephadex-Gele; sie können in feuchtem Zustand unbeschadet 40 Minuten lang im Autoklaven bei 110°C sterilisiert werden - erst beim Erhitzen über 120°C beginnt trockenes Sephadex zu karamelisieren.

Die Gele verändern ihre Eigenschaften in Wasser, Salzlösungen, organischen Lösungsmitteln und in schwach sauren Lösungen nicht. 0,1 n Salzsäure schädigt das Gel erst nach einer Einwirkzeit von etwa 2 Stunden. Ein längeres Einwirken von Oxydationsmitteln ist jedoch zu vermeiden.

b) Die Theorie der Gelfiltration

Im Folgenden wird eine einfache Theorie der Gelfiltration wiedergegeben. Die Theorie beruht auf dem Modell des Gels als dreidimensionales Netzwerk und auf der Tatsache, daß das Dextran-Gel in Form kleiner Kugeln vorliegt.

Die Gelmasse setzt sich aus den gequollenen Gelkörnchen zusammen. Damit ist eine Unterscheidung in drei Volumenanteile möglich:

1) Das Volumen, das sich außerhalb der Gelkörnchen befindet (V_o)

2) Der Volumenanteil, der von dem Lösungsmittel im Innern der Gelkörnchen besetzt wird (V_i)

3) Der Volumenanteil, der durch die Raumbeanspruchung der Dextranketten im Gel selbst gegeben wird (V_g)

Es gilt also die Gleichung:

$$V_t = V_o + V_i + V_g \qquad 5$$

Das Gesamtvolumen (V_t) der Gelmasse ist damit die Summe aus dem äußeren Volumen (V_o), dem inneren Volumen (V_i) und dem Volumen der Gelketten (V_g).

Läßt man nun eine Lösung mit Kornmolekülen durch eine solche Gelmasse strömen, so muß der Verteilungsraum, den diese Moleküle besetzen können, von der Größe der Poren im dreidimensionalen Netzwerk abhängen.

Ist der Molekülradius der Kornmoleküle größer als der maximale Porenradius des dreidimensionalen Netzwerks, so können die Kornmoleküle nicht in das Gel eindringen. Die Moleküle beschränken sich also auf das äußere Volumen.

Durchströmen Kornmoleküle, deren Radius größer als der maximale Porenradius ist, eine mit Gel gefüllte Säule, so können sich diese Moleküle in dem äußeren Volumen (V_o) verteilen. Nach Passage des äußeren Volumens (V_o) erscheinen sie im Eluat der Flüssigkeit, die die Säule verläßt. Es muß das Elutionsvolumen dem äußeren Volumen gleich sein.

$$V_e = V_o \qquad 6$$

Werden durch eine mit Gel gefüllte Säule jedoch Moleküle geschickt, deren Durchmesser gleich dem Durchmesser der Lösungsmittelmoleküle ist, so werden sich diese Moleküle auf das äußere Volumen (V_o) und auf das innere Volumen (V_i) des Gels verteilen. Es muß also das Elutionsvolumen

$$V_e = V_o + V_i \quad \text{sein.} \qquad 7$$

Liegt der Molekülradius der zu verteilenden Moleküle zwischen den Radien der Lösungsmittelmoleküle und dem Porenradius der Gelmatrix, so werden die Moleküle das äußere Volumen (V_o) ganz und das innere Volumen (V_i) zu einem Bruchteil besetzen.

Der Anteil K_d des inneren Volumens (V_i), der von einer solchen Molekülsorte besetzt wird, ist gegeben durch

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \qquad 8$$

Die Auflösung nach V_e ergibt:

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \qquad 8a$$

V_e, V_i und V_o sind meßbare, makroskopische Parameter, die das gelchromatographische Verhalten einer Molekülsorte charakterisieren.

Es ist leicht einzusehen, daß für K_d die folgende Ungleichung gilt:

$$0 \leqq K_d \leqq 1 \qquad 8b$$

Diese Ungleichung ist nur gültig, wenn keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Molekülsorte und der Gelmatrix bestehen. Im Grenzfall $K_d = 1$ ergibt sich Gleichung 7, im Grenzfall $K_d = 0$ ergibt sich Gleichung 6. K_d wird als Verteilungskoeffizient der Molekülsorte bezeichnet. Der Verteilungskoeffizient K_d wiederum ist eine Funktion der Molekülgröße.

Moleküle verschiedener Größe werden also durch die Gelchromatographie voneinander getrennt.

Gilt nämlich für eine Molekülsorte 1:

$$V_{e1} = V_o + K_{d1} \cdot V_i \qquad 9$$

und für eine Molekülsorte 2:

$$V_{e2} = V_o + K_{d2} \cdot V_i \qquad 10$$

so ergibt die Kombination beider Gleichungen:

$$\Delta V_e = V_i \cdot (K_{d1} - K_{d2}) \qquad 11$$

Die Differenz zweier Elutionsvolumina ist bei sonst konstanten Bedingungen proportional der Differenz der Verteilungskoeffizienten.

c) Theorien zur Molekulargewichtsabschätzung mit Hilfe der Gelchromatographie

Die bis jetzt vorliegenden Theorien lassen sich im wesentlichen in drei Gruppen einteilen:

A) In der ersten Gruppe der Theorien [PORATH (11); SQUIRE (12)] werden die ungleichmäßigen Hohlräume des Gels durch einfache geometrische Räume ersetzt. Die Verteilung der Moleküle zwischen dem Gel und dem äußeren Volumen unterliegt den Bedingungen der Gleichgewichtsverteilung bzw. der annähernden Gleichgewichtsverteilung. Untersuchungen, die die Gleichgewichtseinstellung des Verteilungsvorganges berücksichtigen, wurden von ACKERS (13) durchgeführt.

B) ANDREWS (14) und WHITAKER (15) fanden in gewissen Molekulargewichtsbereichen eine empirische Verteilungsmethode. Sie konnten zeigen, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Elutionsvolumen (V_e) oder dem Quotienten $\frac{V_e}{V_o}$ und dem Logarithmus des Molekulargewichtes besteht.

C) In einer von LAURENT und KILLANDER (16) entwickelten Theorie wird die Gelmatrix als ein Netzwerk betrachtet, das aus statistisch verteilten, unendlich langen Stäbchen besteht. Zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten sind hier nötig:

Die Länge der Dextranketten pro cm^3 Gel,
ein angenommener Radius der Dextranketten und
der Äquivalentradius der eindringenden Eiweißmoleküle.

A_1 Die Theorie von PORATH (11)

PORATH geht davon aus, daß sich Makromoleküle verschiedener molekularer Größe in ihren Diffusionskoeffizienten unterscheiden. Das Ausmaß des Eindringens in ein Gel wird damit u.a. von 2 Faktoren abhängen:

a) von dem Diffusionskoeffizienten des zu chromatographierenden Moleküls, sowie

b) von der Porengröße des Gels.

Die Porenweite ist ein Maß für die sterische Behinderung, die ein in das Gel diffundierendes Molekül erfährt. Unter gleichen Bedingungen werden Moleküle mit kleinerem Stokes'schen Radius tiefer in ein Gel eindringen können als Moleküle mit einem größeren Stokes'schen Radius.

Der Stokes'sche Radius (r) ist durch die Gleichung

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \qquad (12)$$

k = Boltzmann'sche Konstante
T = absolute Temperatur
η = Viskosität des Lösungsmittels
D = Diffusionskonstante

gegeben (16).

Die unregelmäßige Form der einzelnen Hohlräume im Gel ersetzt PORATH durch kegelförmige Aussparungen. Auf Grund der statistischen Verteilung der unregelmäßigen Form dieser Hohlräume wird ein mittlerer effektiver Durchmesser (A) und eine Gesamthöhe des Einzelkegels (H) angenommen.

Der Schwerpunkt eines Moleküls mit dem Radius (R) kann sich also innerhalb dieses Kegels in einem freien Volumen v bewegen, wobei h die maximale Eindringtiefe ist, die das Molekül erreichen kann. Dieses Volumen v ist durch die Gleichung

$$v = \frac{h \cdot \pi}{12} \cdot (A - 2R)^2 \qquad 13$$

gegeben.

Das Gesamtvolumen des geometrischen Hohlraums ist

$$V = \frac{H \cdot \pi}{12} \cdot A^2 \qquad 14$$

Der Verteilungskoeffizient K_d ist proportional dem Verhältnis zwischen dem für den Schwerpunkt des Moleküls freien Volumen v und dem Gesamtvolumen des Kegels V.

$$K_d \sim \frac{v}{V}$$

beziehungsweise

$$K_d = k \cdot \frac{v}{V} \qquad 15$$

k = Proportionalitätsfaktor.

Es gilt weiter

$$\frac{h}{H} = \frac{A - 2R}{A} \qquad 16$$

$$K_d = k \cdot \frac{h}{H} \cdot \left(\frac{A - 2R}{A} \right)^2 \qquad 17$$

Aus den obigen Gleichungen 16 und 17 folgt:

$$K_d = k \cdot \left(1 - \frac{2R}{A} \right)^3 \qquad 18$$

Der Verteilungskoeffizient hängt also im Rahmen der PORATH'schen Modellvorstellung des Gels von dem Äquivalentradius (R) des betrachteten Moleküls und dem Durchmesser des Kegels (A) ab. A^3 und der Volumenanteil des Gels, der durch das Lösungsmittel besetzt ist (S_r), müssen einander proportional sein. Es gilt also die Beziehung:

$$A^3 = S_r - \alpha \qquad 19$$

Der Term α berücksichtigt denjenigen Teil des Lösungsmittels, der mit der hydrophilen Gelmatrix so stark assoziiert ist, daß sein Volumen nicht durch ein eindringendes Molekül besetzt werden kann. PORATH fordert weiterhin, daß der Äquivalentradius R der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht proportional sei.

$$R \sim M^{1/2} \qquad 20$$

Diese Proportionalität ist aber nur für Fadenmoleküle, die unter idealen bzw. unter pseudoidealen Bedingungen als statistische Knäuel vorliegen, erfüllt.

Die Kombination der Gleichungen 18, 19, 20 ergibt:

$$K_d = k \cdot \left[1 - k_1 \cdot \frac{M^{1/2}}{(S_r - \alpha)^{1/3}} \right]^3 \qquad 21$$

k_1 = Proportionalitätsfaktor.

Da der von PORATH eingeführte Verteilungskoeffizient die gleiche physikalische Bedeutung wie der in Gleichung 8 eingeführte hat, kann also der K_d-Wert durch Gleichung 8 experimentell bestimmt werden. Nach Gleichung 21 besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der dritten Wurzel aus dem K_d-Wert und der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht. Die Gültigkeit dieser Gleichung ist aber durch die Annahme, daß der Trägheitsradius proportional ist der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht, auf Fadenmoleküle eingeschränkt.

Trotz dieser Einschränkung konnten DETERMANN und WIELAND (19) zeigen, daß diese Gleichung auch für globuläre Proteine befriedigend erfüllt ist. In der folgenden Darstellung wird der von DETERMANN und WIELAND experimentell gefundene Zusammenhang zwischen $K_d^{1/3}$ und $M^{1/2}$ gezeigt.

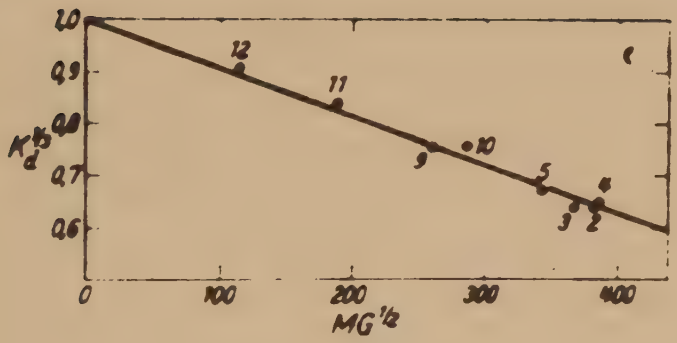

Abb. 5: Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten (K_d) vom Molekulargewicht (MG) für globuläre Proteine

(nach WIELAND und DETERMANN)

A_2 Die Theorie von SQUIRE (12)

In der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen K_d-Wert und Molekulargewicht geht SQUIRE von einem ähnlichen Modell aus wie PORATH. Der Autor ersetzt die unregelmäßigen Hohlräume im Gel durch Zylinder, Kegel und Parallelepipede. Die Anteile (V_p) der einzelnen Hohlkörper an dem gesamten nicht ausgeschlossenen Volumen werden willkürlich gewählt, aber so, daß der gefundene Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen und dem Molekulargewicht befriedigend wiedergegeben wird. SQUIRE findet folgende Beziehung für die Abhängigkeit des Quotienten aus dem nicht ausgeschlossenen und dem äußeren Volumen der Gelsäule vom Molekulargewicht:

$$\frac{V_p}{V_o} = \left[1 + g \left(1 - \frac{M^{1/3}}{C^{1/3}} \right) \right]^3 \qquad 22$$

g und $C^{1/3}$ sind Konstanten, die unter besonderen experimentellen Bedingungen ermittelt werden können (s.u.)

Wird unter Gleichgewichtsbedingungen chromatographiert, so muß das nicht ausgeschlossene Volumen V_p für eine Molekülsorte dem Elutionsvolumen gleich sein. Es kann also V_p durch V_e ersetzt werden. Löst man die Gleichung 22 nach dem Molekulargewicht auf, so erhält man in diesem Falle:

$$M^{1/3} = \frac{C^{1/3}}{g} \left[1 + g - \left(\frac{V_e}{V_o} \right)^{1/3} \right] \qquad 23$$

V_e = Elutionsvolumen
V_o = äußeres Volumen

Wird $V_e = V_o$ gesetzt,
so vereinfacht sich die Gleichung 23 zu

$$M^{1/3} = C^{1/3} \qquad 24$$

Die Bedingung $V_e = V_o$ wird von einer Substanz erfüllt werden, die nicht mehr in das Gel eindringen kann (Gl. 6). Die Konstante C ist dann also gleich dem Molekulargewicht derjenigen Substanz, die nicht mehr in das Gel eindringen kann.

In den folgenden Abbildungen werden die von SQUIRE tabellierten Untersuchungen entsprechend der Gleichung 33 graphisch dargestellt (12).

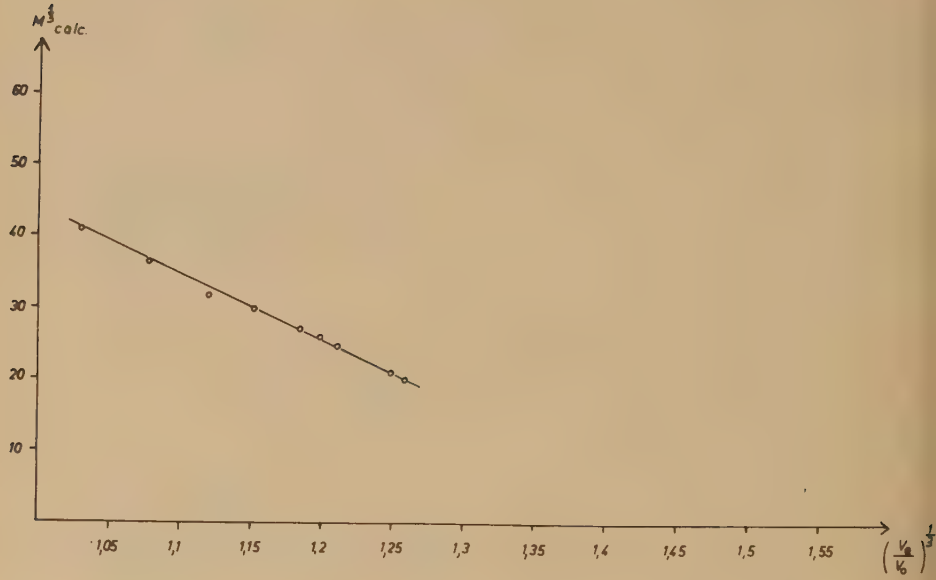

Abb. 6: Die Beziehung zwischen dem Molekulargewicht von Proteinen und ihrem Elutionsvolumen bei der Gelfiltration mit Sephadex G 75 (SQUIRE)

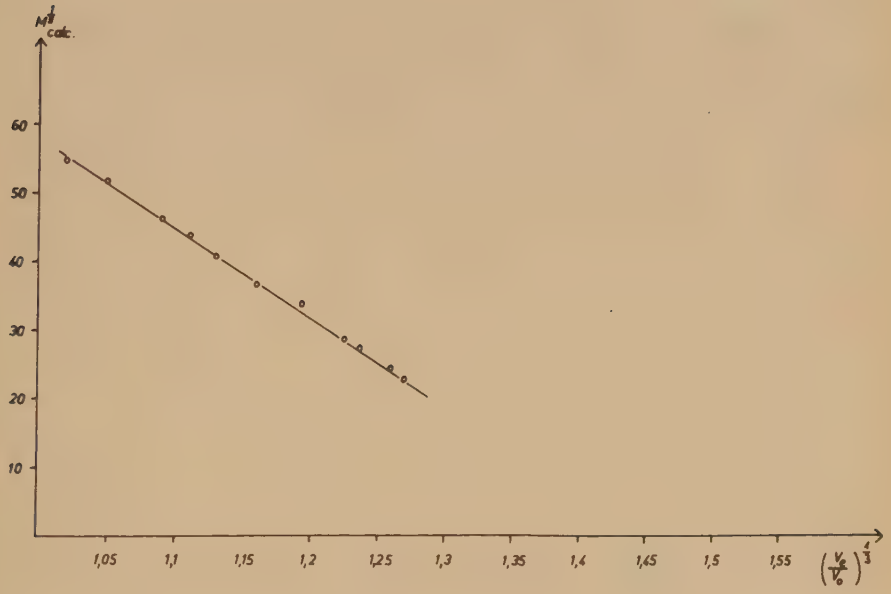

Abb. 7: Die Beziehung zwischen dem Molekulargewicht von Proteinen und ihrem Elutionsvolumen bei der Gelfiltration mit Sephadex G 100 (SQUIRE)

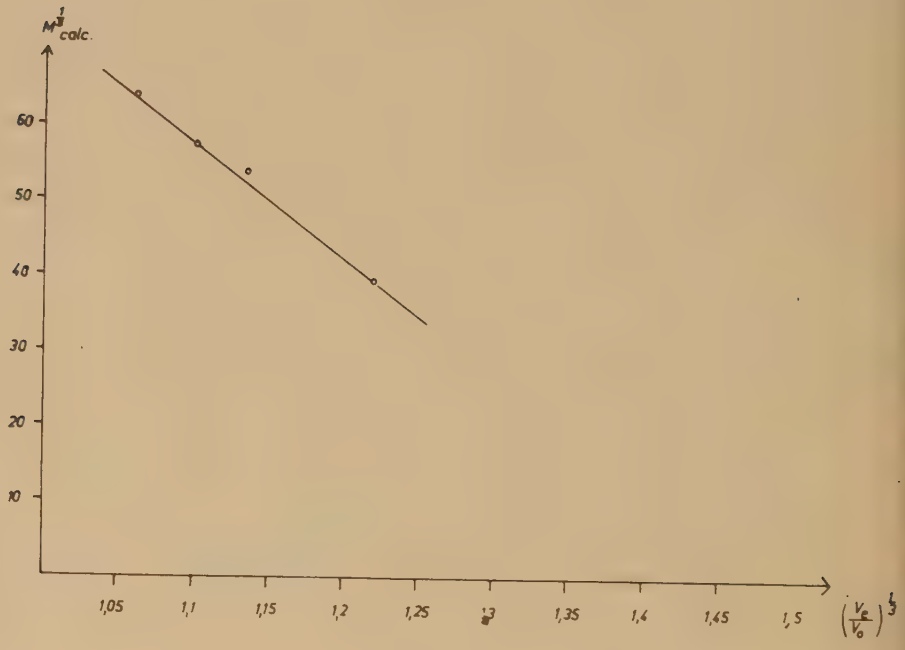

Abb. 8: Die Beziehung zwischen dem Molekulargewicht von Proteinen und ihrem Elutionsvolumen bei der Gelfiltration mit Sephadex G 200 (SQUIRE)

Diese Betrachtung von SQUIRE unterscheidet sich in einem wesentlichen Punkt von der PORATH's. SQUIRE setzt voraus, daß der Äquivalentradius der betrachteten Moleküle proportional der dritten Wurzel aus dem Molekulargewicht sei; eine Annahme, die für Kornmoleküle immer gültig ist. Im Gegensatz dazu nahm PORATH an, daß der Radius proportional der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht sei.

ACKERS (13) untersuchte das gelchromatographische Verhalten von globulären Proteinen unter den Bedingungen des Gleichgewichtes und des Ungleichgewichtes. Die Versuche, die zu einer Gleichgewichtsverteilung führen, wurden in einer Suspension der Gelkörnchen in ruhender Flüssigkeit durchgeführt; diejenigen, welche die Abweichungen vom Gleichgewicht erfassen sollten, in einer Säule. Um den Verteilungskoeffizienten K_d^* unter Gleichgewichtsbedingungen zu ermitteln, führte ACKERS folgende Gleichungen ein, welche die experimentell meßbaren Größen mit K_d^* verbinden. Er definierte den Verteilungskoeffizienten als den Quotienten aus dem von einer Molekülsorte besetzbaren, nicht ausgeschlossenen Volumen (V_p) und dem inneren Volumen des Gels (V_i):

$$K_d^* = \frac{V_p}{V_i} \qquad 25$$

Das nicht ausgeschlossene Volumen V_p drückt ACKERS durch die Gesamtmenge (Q_t) der zu untersuchenden Substanz, durch ihre Konzentration zwischen den Gelkörnchen (C_o), das Volumen zwischen den Gelkörnchen (V_l) und die Konzentration der Substanz innerhalb der Gelmatrix (C_p) aus. Er erhält damit:

$$V_p = \frac{Q_t - C_o \cdot V_l}{C_p} \qquad 26$$

Unter der Annahme, daß im Gleichgewicht

$C_p = C_o$

ist, lassen sich die Gleichungen 25 und 26 zu folgendem Ausdruck zusammenfassen:

$$K_d^* = \frac{\frac{Q_t}{C_o} - V_1}{V_i} \qquad 27$$

Für den Fall, daß

$K_d^* = 0$

ist, geht die Gleichung in die Form über:

$$V_1 = \frac{Q_t}{C_o} \qquad 28$$

Ist $K_d^* = 1$, so muß

$$V_i = \frac{Q_t}{C_o} - V_1 \qquad 29$$

sein.

ACKERS vergleicht die Gleichung 27 mit Gleichung 8. Es ergibt sich daraus:

$$V_e - V_o = \frac{Q_t}{C_o} - V_1 \qquad 30$$

Die Differenz $V_e - V_o$ stellt denjenigen Anteil des inneren Volumens dar, der in einer Säule während der Verteilungschromatographie besetzt werden kann. Er hängt damit unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen von der Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels ab.

Unter Gleichgewichtsbedingungen sollte die Gleichung 30 volle Gültigkeit haben.

Für den Fall eines Nicht-Gleichgewichts gilt:

$$V_e - V_o < \frac{Q_t}{C_o} - V_1 \qquad 31$$

Die Gültigkeit bzw. die Abweichung von Gleichung 30 untersuchte der Autor bei den Sephadex-Geltypen G 75, G 100, G 200. Wie die folgenden Abbildungen zeigen, ist bei den Geltypen G 75 und G 100 die Gleichung 30 unter Flußbedingungen annähernd erfüllt.

Lediglich Äquivalentradien über 25 Å bei dem Gel G 100 weichen bei den vorgegebenen Flußbedingungen von der Gleichgewichtsverteilung ab.

Bei dem Gel G 200 konnte gezeigt werden, daß bei einer Flußgeschwindigkeit von 1,36 cm^3 / $cm^2 \cdot h$ bis 5,45 cm^3/ $cm^2 \cdot h$ das Gleichgewicht unabhängig von dem Äquivalentradius nicht erreicht werden kann.

Die folgenden Abbildungen geben die experimentellen Ergebnisse von ACKERS wieder:

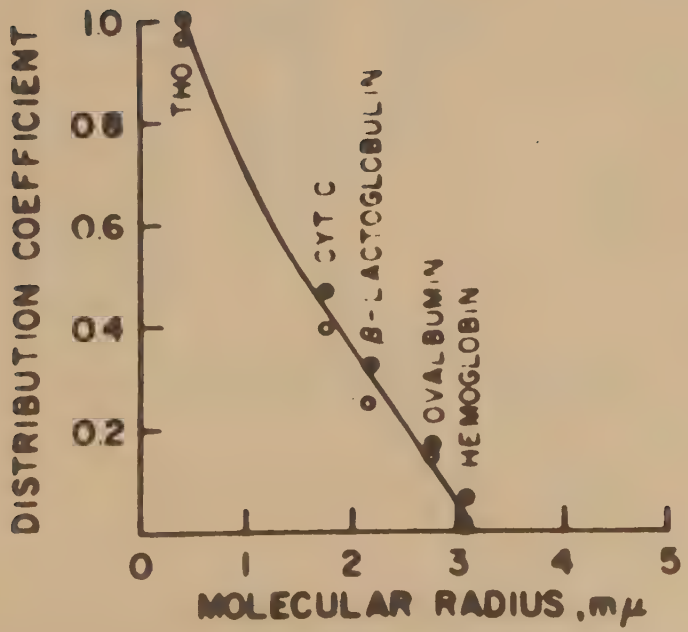

Abb. 9: Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K_d bzw. des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten K_d^* (Ordinate) von dem Äquivalentradius der chromatographierten Moleküle (Abszisse) für das Gel Sephadex G 75

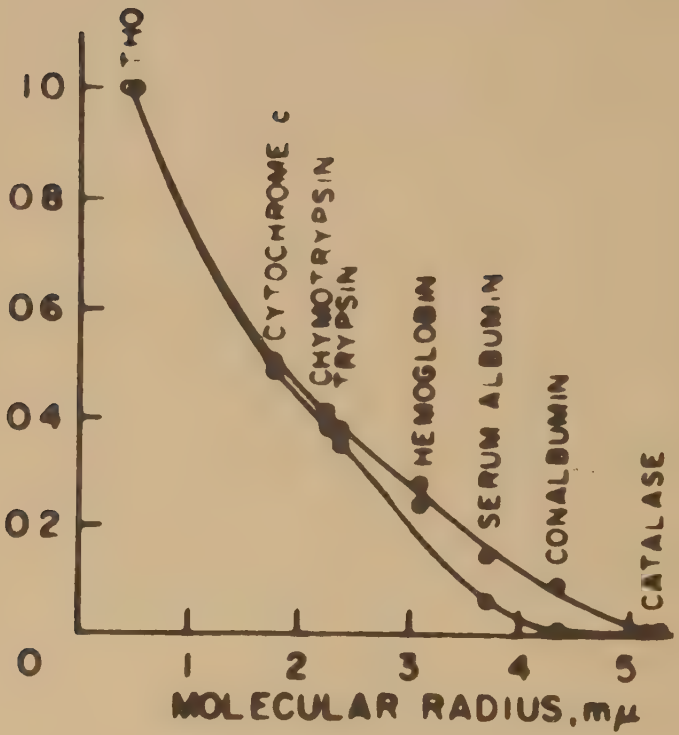

Abb. 10: Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K_d bzw. des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten K_d^* (Ordinate) von dem Äquivalentradius der chromatographierten Moleküle (Abszisse) für das Gel Sephadex G 100

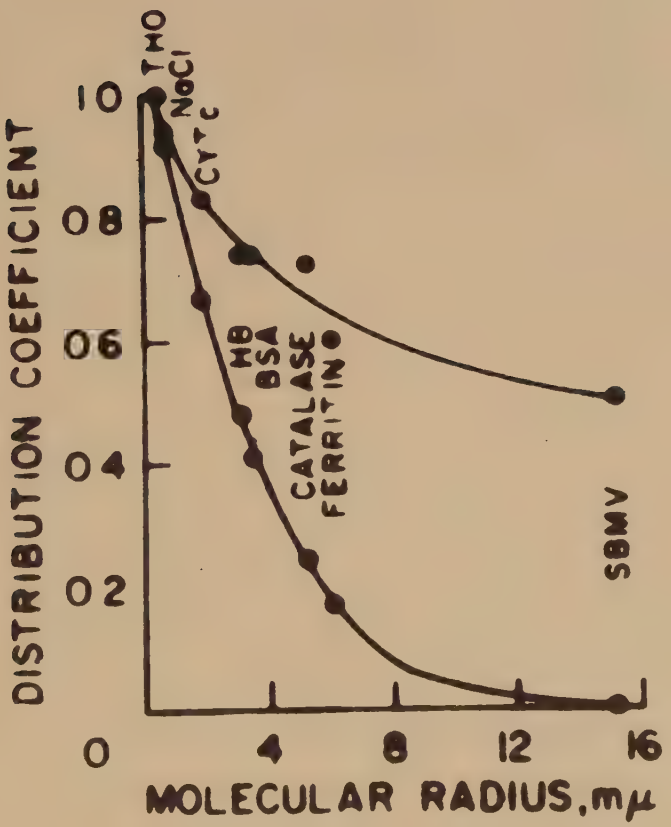

Abb. 11: Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K_d bzw. des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten K_d^* (Ordinate) von dem Äquivalentradius der chromatographierten Moleküle (Abszisse) für das Gel Sephadex G 200

V_o (Gl. 30) wurde mit Hilfe des Tabakmosaikvirus und V_i mittels Tritium-markierten Wassers (THO) bestimmt. Das stark abweichende Verhalten des Gels Sephadex G 200 veranlaßte ACKERS, für diesen Geltyp ein besonderes Modell des Verteilungsmechanismus zwischen Gelphase und flüssiger Phase zu entwickeln. Für G 200 führte er den Mechanismus der eingeschränkten Diffusion zur Erklärung des chromatographischen Verhaltens der Substanz ein.

Dieses Modell der eingeschränkten Diffusion wurde von RENKIN (20) und FAXÉN (21) entwickelt. Es ersetzt die komplizierte Gelmatrix durch ein System einheitlicher zylindrischer Kanäle; den Eintrittsporen wird ein virtueller Porenradius r zugeordnet. Trifft nun ein Molekül mit dem Stokes'schen Radius a auf eine solche Pore, so wird die Wahrscheinlichkeit des Eintritts für ein Molekül mit großem Äquivalentradius geringer sein als für ein Molekül mit entsprechend kleinerem Radius. Der Anteil der Molekülfläche A_r an der Gesamtfläche der Poren A_o ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$\frac{A_r}{A_o} = (1-\frac{a}{r})^2 \cdot \left[1 - 2{,}104 \cdot \frac{a}{r} + 2{,}09 \cdot (\frac{a}{r})^2 - 0{,}95 \cdot (\frac{a}{r})^3\right] \qquad 32$$

Der erste Term $(1 - \frac{a}{r})^2$ ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Eintritts in diesen Zylinder.

Ist a = r, so wird dieser Term = 0; das Molekül kann nicht eintreten. Für den Fall, daß a < r ist, wird das Molekül in die Poren eintreten können. Wird der Ausdruck $\frac{a}{r} \ll 1$, so ist die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt in die Pore nahezu 1.

Der zweite Term berücksichtigt das Verhalten des in den Zylinder diffundierenden Moleküls unter der Annahme, daß das diffundierende Molekül etwa von der gleichen Größenordnung ist wie die Dimension des Zylinders (FAXÉN).

ACKERS setzt das Verhältnis $\frac{A_r}{A_o}$ als Verteilungskoeffizient und kann nun bei bekanntem mittleren Porenradius des Gels und bekanntem Äquivalentradius des Moleküls den vorausberechenbaren Verteilungskoeffizienten mit dem experimentell ermittelten vergleichen. Die Abbildung 12 stellt die von ihm gefundene gute Übereinstimmung dar:

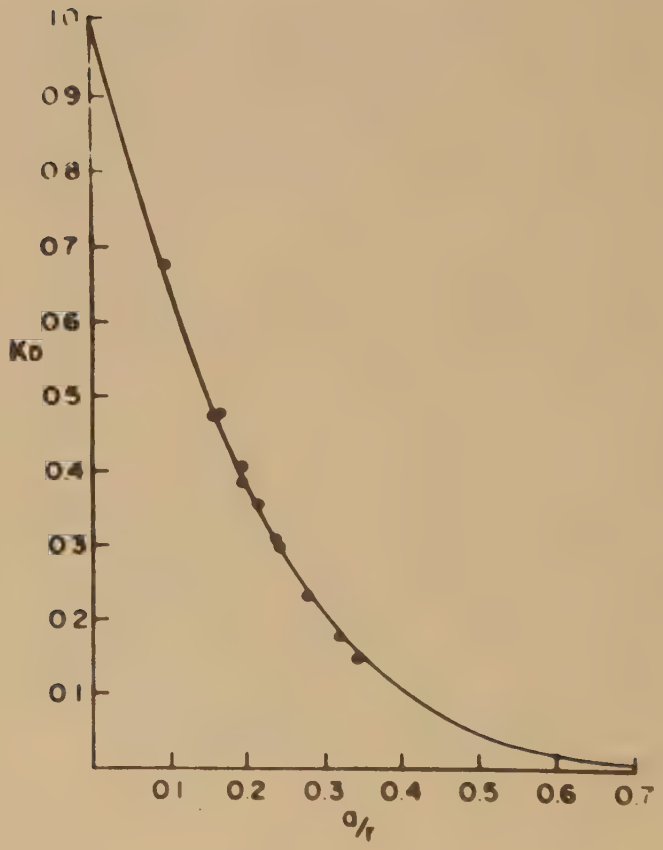

Abb. 12: Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten (K_d) von dem Term ($\frac{a}{r}$)

Diesen hier diskutierten Theorien ist gemeinsam, daß sie das dreidimensionale Netzwerk durch ein geometrisches Modell ersetzen. Die Modellrechnungen lassen den Zusammenhang zwischen dem K_d-Wert und dem Molekulargewicht oder dem Elutionsvolumen und dem Molekulargewicht ausreichend wiedergeben.

B_1 ANDREWS (14)

gibt eine empirische Methode zur Ermittlung des Molekulargewichtes einer Substanz an. Für eine Reihe von Eiweißen bekannten Molekulargewichtes werden die Elutionsvolumina gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. Er konnte zeigen, daß für das Gel Sephadex G 75 eine lineare Abhängigkeit des Elutionsvolumens von Molekulargewichten zwischen 3000 und 70 000 besteht. Für das weitporigere Gel Sephadex G 100 besteht die lineare Abhängigkeit zwischen 3000 und 100 000. Eine von ihm angegebene Eichkurve für eine Säule wird in der folgenden Abbildung 13 wiedergegeben.

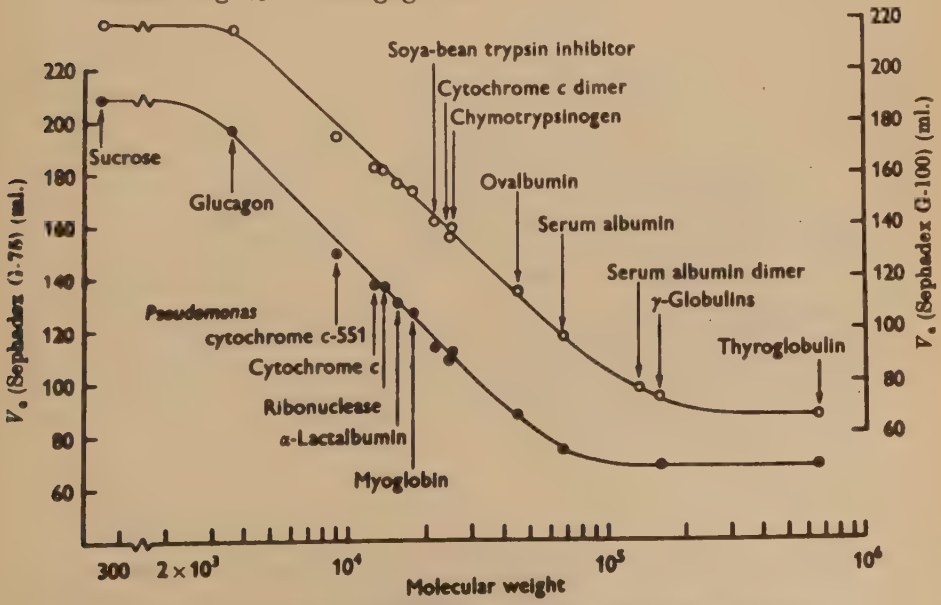

Abb. 13: Die von ANDREWS angegebene Eichkurve für die Gele Sephadex G 75 und G 100

B_2 WHITAKER (15)

fand auf empirischem Wege, daß für die Sephadex-Arten G 75 und G 100 eine gute Korrelation zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes globulärer Proteine und dem Quotienten aus dem Elutionsvolumen der einzelnen Proteine und dem äußeren Volumen der Gelsäule besteht. Er konnte zeigen, daß für Sephadex G 75 folgende Gleichung gilt:

$$\log.\text{Molekulargew.} = 0{,}660 \pm 0{,}054 \left(\frac{V_e}{V_o} - 1\right) + 4{,}785 \pm 0{,}04$$

Für Sephadex G 100 gilt:

$$\log.\text{Molekulargew.} = 0{,}973 \pm 0{,}012 \left(\frac{V_e}{V_o} - 1\right) + 5{,}190 \pm 0{,}010$$

Man kann also aus diesen Gleichungen ableiten, daß Serumalbumin (Molekulargewicht = 70 000) und γ_1-Globulin (Molekulargewicht = 150 000) bei den Sephadextypen G 75 und G 100 nicht mehr zwischen dem inneren und dem äußeren Volumen verteilt werden.

C LAURENT und KILLANDER (16)

gingen von der von FLODIN und PORATH (17) demonstrierten Annahme aus, daß die Lage des Elutionsmaximums nur wenig von der Elutionsgeschwindigkeit beeinflußt wird. Dies besagt, daß die Position einer Substanz im Chromatogramm von dem Volumen innerhalb der Gelkörnchen bestimmt wird, das von einer Substanz besetzbar ist. In der folgenden Darstellung sind die Mechanismen schematisch dargestellt, die nach LAURENT et al. die Verteilung der Substanzen im Gel bestimmen.

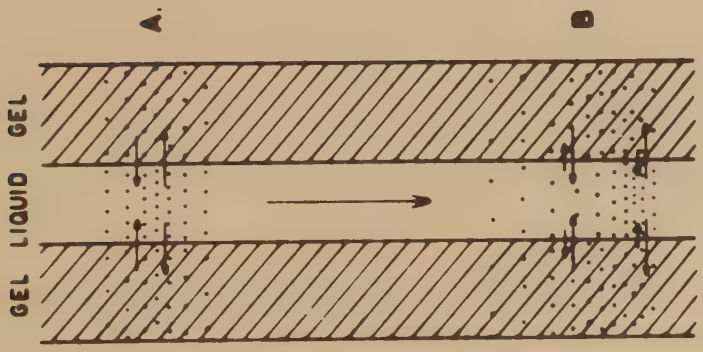

Abb. 14: Schematische Darstellung der Verteilungsmechanismen der sich im Gel verteilenden Substanzen (LAURENT und KILLANDER)

Man kann sich ein Gelbett aus zwei Phasen zusammengesetzt vorstellen:

1) V_x : Volumen der Gelphase (Abb. 14: Gel)

2) V_o : Volumen der flüssigen Phase (Abb. 14: Liquid)

Da die Gelphase dem Fluß des Elutionsmittels einen großen Widerstand entgegensetzt, nehmen LAURENT et al. an, daß der Transport der gelösten Moleküle überwiegend in der flüssigen Phase erfolgt.

Im Idealfall wird sich eine in das System eingebrachte Substanz entsprechend dem Gleichgewicht zwischen flüssiger Phase und Gelphase verteilen. Doch nur eine gewisse Fraktion, K_{av} der Gelphase, d.h. das Volumen $K_{av} \cdot V_x$ des Gels kann von dieser Substanz besetzt werden.

Die Substanz, die vollkommen vom Eindringen in das Gel ausgeschlossen wird, tritt mit einem Volumen $V_e = V_o$ aus (Gl. 6).

Das Elutionsvolumen für eine Substanz, die in das Gel eindringen kann, ist analog Gleichung 8a durch .

$$V_e = V_o + K_{a\,v} \cdot V_x \qquad 33$$

gegeben. Wenn das gesamte Gelbettvolumen

$$V_t = V_o + V_x \qquad 34$$

ist, so ist nach Gleichung 33

$$k_{a\,v} = \frac{V_e - V_o}{V_x} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \qquad 35$$

Zur Bestimmung von $K_{a\ v}$ muß man das Gelbettvolumen V_t, das Elutionsvolumen V_e und das Volumen zwischen den Gelkörnchen V_o ermitteln. Der von LAURENT und KILLANDER (16) angegebene Verteilungskoeffizient K_{av} weicht von dem Wert K_d ab; zur Ermittlung von K_d wird V_i, zur Bestimmung von K_{av} $V_x = V_i + V_g$ benutzt (vgl. Gl. 5).

Qualitative Betrachtungen über den Einfluß der Elutionsgeschwindigkeit auf das Elutionsvolumen und die Form der Elutionsbande

LAURENT und KILLANDER (16) nehmen an, daß unter nicht-idealen Bedingungen, d.h. also, wenn sich das Gleichgewicht nicht sofort einstellt, der Einfluß der Diffusionsgeschwindigkeit der sich in das Gel verteilenden Proteine merklich wird. Die Geschwindigkeit, mit der das Diffusionsgleichgewicht erreicht wird, wird durch die Größe der Gelkörnchen und durch die Diffusionsgeschwindigkeit der globulären Proteine in das Gel bestimmt sein. Die Diffusionsgeschwindigkeit in das Gel ist selbst eine Funktion der freien Diffusionsgeschwindigkeit und der Konzentration der zu untersuchenden Substanz, ebenso auch der Konzentration und Struktur des Gels.

Wenn die gelöste Substanz mit einer endlichen Flußgeschwindigkeit durch das Gelbett strömt, wird die horizontale Diffusion zwischen der flüssigen Phase und der Gelphase in der Front der zu chromatographierenden Substanz zu keiner Gleichgewichtseinstellung führen (Abb.14). Das Ergebnis ist eine höhere Konzentration in der flüssigen Phase an der Front der Elutionsbande. Andererseits wird in dem rückliegenden Teil der Elutionsbande die Konzentration in der Gelphase größer sein als in der flüssigen Phase.

Dieses Verhalten kann so interpretiert werden, als wenn sich eine Zone des Gelösten in der flüssigen Phase vor einer Zone des Gelösten in der Gelphase bewegt. Der Effekt wird um so deutlicher, je höher die Flußgeschwindigkeit ist. Um so mehr wird auch eine Verbreiterung und Asymmetrie der Elutionsbande auftreten. Die Lage des Elutionsmaximums jedoch wird sich, wie LAURENT und KILLANDER feststellen, dabei nur wenig ändern. Die vertikale Diffusion entlang dem Gelbett bewirkt eine weitere Herabsetzung der Konzentration der zu chromatographierenden Substanz in der flüssigen Phase und damit eine Verbreiterung der Bande. Aber auch sie wird die Lage des Elutionsmaximums im Chromatogramm nicht merklich ändern. Die erwähnten Effekte bewirken also im wesentlichen eine Verbreiterung und eine Asymmetrie der Elutionsbande.

Um das für die einzelnen Molekülsorten besetzbare Volumen im Gel zu errechnen, ist es nötig, ein physikalisches Modell des Gelnetzwerkes zu entwickeln. Das einfachste Modell ist: Die Dextranketten sind starre Stäbchen, die unendlich lang und statistisch verteilt sind.

OGSTON (22) hat das besetzbare Volumen für eindringende sphärische Partikel in einem solchen System berechnet.

Er fand folgende Gleichung:

$$K_{av} = \exp \left[- \pi L \left(r_s + r_r \right)^2 \right] \qquad 36$$

L = Konzentration der Stäbchen ausgedrückt als Stäbchenlänge pro cm^3 gequollenes Gel

r_s = Stokes'scher Radius der sphärischen Partikel

r_r = Radius des Stäbchens

Dieses Modell enthält notwendigerweise Vereinfachungen, denn die Dextranketten im Gel sind verzweigt und es findet eine gewisse Rotation an den glykosidischen Bindungen statt; zudem können Mikroheterogenitäten im Gel vorkommen. Diese Effekte bewirken im wesentlichen eine Verkürzung und Verdickung der Kette.

Diese Effekte werden von den Autoren berücksichtigt, indem sie den Radius der Dextranketten mit $7 \cdot 10^{-8}$ cm annehmen, ein Radius, der 2-3 mal größer ist als der aus Röntgendaten oder Streulichtmessungen gewonnene.

Die Länge L der starren Stäbchen wurde so gewählt, daß die errechnete Kurve, welche die Gleichung 36 erfüllt, sich der experimentellen soweit wie möglich angleicht. Für die einzelnen Gelsorten erfüllen folgende Längen der starren Stäbchen diese Bedingung:

Geltyp	Länge der Stäbchen in cm	
G 25	$14{,}0 \cdot 10^{12}$	
G 50	$8{,}2 \cdot 10^{12}$	
G 75	$4{,}6 \cdot 10^{12}$ bzw. $4{,}8 \cdot 10^{12}$	
G 100	$(2{,}9 \cdot 10^{12})$	bzw. $3{,}8 \cdot 10^{12}$
G 200	$1{,}6 \cdot 10^{12}$	
	A	B

Tab. 4: Die von LAURENT u. KILLANDER (16) angegebenen Längen der starren Stäbchen. Die A-Werte wurden dem Text entnommen, während der B-Wert aus einer Abbildung (16) S.327, Abb.6 entnommen wurde.

Zur Auswertung gelchromatographischer Experimente wird der K_{av}-Wert gegen den Stokes'schen Radius der Proteine aufgetragen. Es muß dann der zu erwartende exponentielle Abfall mit steigendem Äquivalentradius eintreten.

Das Produkt aus der Länge der starren Stäbchen und dem von LAURENT und KILLANDER angenommenen Radius der Dextranketten müßte annähernd das Volumen des Dextrans pro cm^3 Gel ergeben.

Auf der anderen Seite läßt sich aus der Wasseraufnahme und dem partiellen spezifischen Volumen des Dextrans in Lösung ebenfalls die Konzentration des Dextrans pro cm^3 Gel ausrechnen. Stimmen beide Ergebnisse überein, so sind die von LAURENT und KILLANDER angenommenen Zahlen für L und r physikalisch sinnvoll.

Es wird dies am Beispiel des Dextrangels Sephadex G 100 durchgerechnet. Sephadex G 100 hat auf Grund der Tab. 3 eine Wasseraufnahme von 10,0 $\pm$ 1,0 ml/g trockenes Sephadex. Das partielle spezifische Volumen des Dextrans beträgt 0,61 ml/g.

Der Volumenanteil der Dextranketten in cm^3 Dextran pro cm^3 gequollenes Gel (V^+) beträgt damit

$$\frac{0,61}{11,6} < V^+ < \frac{0,61}{9,61} \quad \text{oder} \quad 0,052 < V^+ < 0,063$$

(V^+ ist eine dimensionslose Größe).

Diese letztere Abschätzung gestattet den direkten Vergleich mit dem aus dem Produkt $\pi \cdot L \cdot r_r^2$ (Tab. 5) zu ermittelnden Volumenanteil des Gels pro cm^3 starre Stäbchen, welcher 0,0585 beträgt.

Tabelle 5: Legende S. 56

Sephadex Typ	Wasseraufnahme (ml) / g Sephadex	Gesamtvol. (ml), gebildet v. 1 g gequoll. Gel	Konz. Dextran (g)/ml gequoll. Gel	A Vol. Dextranketten (cm^3) pro cm^3 gequoll. Gel	Errechnete Abweichg. v. Mittelwert A	Länge v. L (cm) nach Angabe v. L. und K. (16)	B Errechnetes Vol. der Dextranketten ($L.r^2$)	Abweichg. d. Wertes B in % v. Mittelwert A (A=100 %)
G 25	2,5±0,2	3,1±0,2	$\frac{1}{2,9}$ $\frac{1}{3,3}$ 0,345 – 0,303 → 0,324	$\frac{0,61}{3,3}$ $\frac{0,61}{2,9}$ 0,185 – 0,210 → 0,197	± 7 %	$14,0 \cdot 10^{12}$	0,215	± 9 %
G 50	5,0±0,3	5,6±0,3	$\frac{1}{5,3}$ $\frac{1}{5,9}$ 0,188 – 0,169 → 0,178	$\frac{0,61}{5,9}$ $\frac{0,61}{5,3}$ 0 10 – 0,115 → 0,107	± 7 %	$8,2 \cdot 10^{12}$	0,126	± 17 %
G 75	7,5±0,5	8,1±0,5	$\frac{1}{7,6}$ $\frac{1}{8,6}$ 0,132 – 0,116 → 0,124	$\frac{0,61}{8,6}$ $\frac{0,61}{7,6}$ 0,071 – 0,080 → 0,075	± 6 %	$4,6 \cdot 10^{12}$ $4,8 \cdot 10^{12}$	0,0708 0,072 0,0738	± 4 %
G 100	10,0±1,0	10,6±1,0	$\frac{1}{9,6}$ $\frac{1}{11,6}$ 0,104 – 0,086 → 0,095	$\frac{0,61}{11,6}$ $\frac{0,61}{9,6}$ 0,052 – 0,063 → 0,057	± 10 %	$2,9 \cdot 10^{12}$ $3,8 \cdot 10^{12}$	0,045 0,0585	± 12 % ± 2 %
G 200	20,0±2,5	20,6±2,5	$\frac{1}{18,1}$ $\frac{1}{23,1}$ 0,052 – 0,043 → 0,048	$\frac{0,61}{23,1}$ $\frac{0,61}{18,1}$ 0,026 – 0,034 → 0,03	± 12 %	$1,6 \cdot 10^{12}$	0,025	± 16 %

Legende Tabelle 5: Von LAURENT und KILLANDER angegebene Werte der einzelnen Sephadex-Typen. Die aus der Wasseraufnahme und dem partiellen spezifischen Volumen des Dextrans errechneten Volumina der Dextranketten pro cm^3 Gel (Spalte A) zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit dem aus der Länge L und dem Radius r der starren Stäbchen errechneten Volumina (Spalte B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es den Autoren gelungen ist, über die von PORATH und SQUIRE entwickelten Modelle hinaus durch Einführen des Modells der statistisch verteilten starren Stäbchen eine physikalisch fundierte Betrachtungsweise der Gelchromatographie zu entwickeln.

D EXPERIMENTELLER TEIL

a) Die Bestimmungsmethode der Proteinkonzentration

Methode:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Eluat gibt es u.a. zwei Möglichkeiten:

1) die Messung der Lichtabsorption bei 250 oder 280 nm
2) die Bestimmung der Proteinkonzentration im Eluat mit der Folin-Lowry-Methode (23), die 10 bis 12 mal empfindlicher ist.

Beide Methoden gestatten keine Messung der absoluten Proteinkonzentration im Eluat: Die Lichtabsorption bei 280 nm hängt nicht nur von der Proteinkonzentration, sondern auch von den unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine ab, die im Gemisch vorhanden sind. Das gleiche gilt für die Extinktion der Reaktionsprodukte in der Folin-Lowry-Reaktion, die außerdem dem Beer'schen Gesetz nicht folgt. Die Reaktionsprodukte der Folin-Lowry-Reaktion haben eine geringere Abhängigkeit der Extinktion von der Proteinzusammensetzung als die gleichen bei 280 nm gemessene Proteine. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt in der vorliegenden Untersuchung mittels einer automatisierten Modifikation der Folin-Lowry-Reaktion.

Das Prinzip der Folin-Lowry-Methode beruht auf

1) der Erfassung der Peptidbindung durch Biuretreagenz
2) der Reduktion des Phosphor-Molybdän-Wolfram-Reagenz bei Anwesenheit von Tyrosin und Tryptophan in dem untersuchten Protein.

Die zu untersuchenden Eiweiße werden durch Alkali denaturiert und anschließend colorimetrisch erfaßt. Die zu bestimmende Proteinkonzentration wird mit bekannten Konzentrationen von Eichlösungen verglichen.

Apparatur:

Das System setzt sich aus einer Kombination von Auto-Analyzer-Elementen zusammen.

Fließdiagramm:

Das Fließdiagramm wird in Abbildung 15 wiedergegeben.

Reagenzien:

(Soweit nicht anders vermerkt, werden zur Herstellung der Reagenzien die Präparate der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die jeweilige Katalognummer ist in Klammern angegeben).

1) Soda-NaOH-$CuSO_4$-KNaTartrat-Lösung

Herstellung:

Lösung I:
0,25 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ p.A. (Nr. 2790)
werden in 100 cm^3 H_2O gelöst.

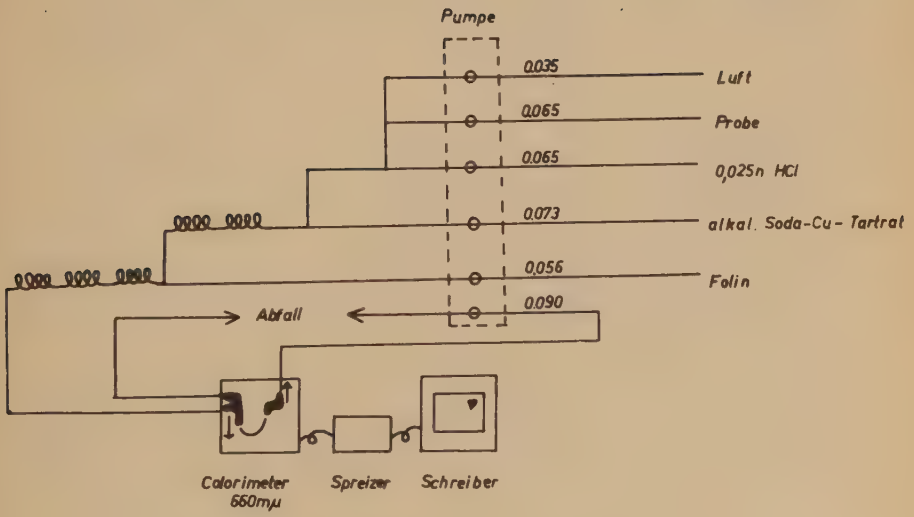

Abb. 15: Das Fließdiagramm der Bestimmung der Proteinkonzentration im Eluat der gelchromatographischen Trennung

Lösung II:

0,75 g KNaTartrat p.A. (Nr. 8087)

20,0 g Na_2CO_3 wasserfrei p.A. (Nr. 6392)

600,0 cm^3 1n NaOH p.A. (Nr. 9137)

Die Lösungen I und II werden vereinigt.

2) Folin-Reagenz

hergestellt nach Vorschrift von Folin-Cioalteu

[HOPPE-SEYLER, THIERFELDER, Physiol. und physiol.chem. Analysen, 10. Auflage III/1, S. 600 (26)]

Man löst in einem Rundkolben:

700 ml H_2O (deionisiert)

100 g $Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$ (Nr. 6673)

100 g $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (Nr. 6521)

Zu diesem Gemisch gibt man zunächst

50 ml 85 %ige Phosphorsäure (Nr. 573), dann

100 ml HCl (min. 32 %; Nr. 319).

Das Ganze wird am Rückflußkühler unter dem Abzug 10 Stunden lang gekocht. In die warme Lösung gibt man 150 g Lithiumsulfat (Nr. 5695), 50 ml H_2O und einige Tropfen Brom (Nr. 1948). Nun kocht man die Mischung 15 Minuten lang ohne Kondensator, um das überschüssige Brom zu entfernen. Nach dem Abkühlen verdünnt man auf 1 l und filtriert mit Filter 602 (hart). Das Reagenz sollte keine grünliche Farbe haben. Ist das der Fall, so kann mit Tropfen erneut zugesetzten Broms die Lösung wieder aufoxydiert werden.

Die fertige Folin-Lösung wird zur Messung auf eine Endverdünnung 1 : 3 gebracht (d.h. 1 Teil Folin-Reagenz + 2 Teile H_2O).

Filter:
Die Absorption der Reaktionslösung wird in einer Mikroküvette bei 660 nm gemessen.

pH-Wert:
Der pH-Wert ist durch die Konzentration des im System verwendeten Puffers festgelegt. Der 0,1m Na-acetatpuffer, der 1 molar an NaCl ist, hat pH 5,6.

Eichlösungen:
Die Eichlösungen der einzelnen Eiweißkörper werden durch Lösen der einzelnen Proteine in 0,1m Na-acetatpuffer-1m NaCl hergestellt. Entsprechend den jeweils zu untersuchenden Eiweißkörpern werden Proben aufgegeben, die 5, 10, 20, 50 und 100 µg Eiweiß pro ml enthalten. Die Eichlösungen werden bei Nichtgebrauch im Kühlschrank bei + 4°C nicht länger als 3 Tage aufbewahrt.

Empfindlichkeit:
In diesem Testsystem können noch Eiweißkonzentrationen von 1 µg/ml erfaßt werden. Die Empfindlichkeit ist bei den einzelnen Eiweißarten entsprechend der Spezifität der Reaktion unterschiedlich.

Im Folgenden wird eine repräsentative Eichkurve wiedergegeben:

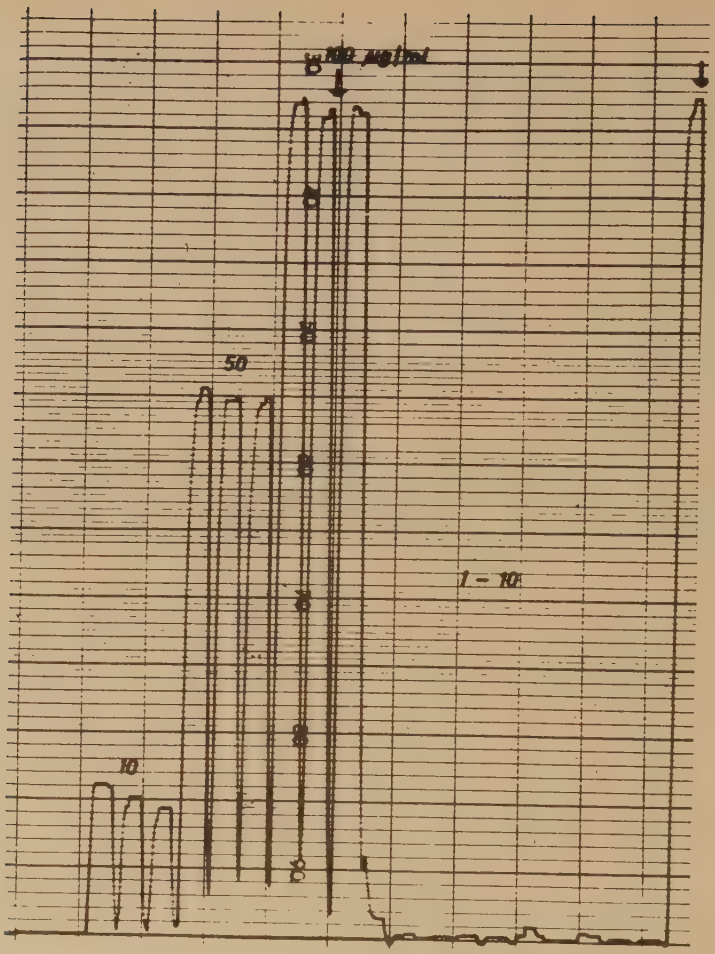

Abb. 16: Die Darstellung einer Eichkurve, die aus dem Testprotein Ovalbumin gewonnen wurde

Die Bestimmungsmethode der proteolytischen Enzymaktivität

Prinzip:

Bei geeigneter Wasserstoffionenkonzentration wirkt die proteolytische Enzymaktivität, die gemessen werden soll, auf das Substrat Hämoglobin ein. Es entstehen Spaltprodukte des Hämoglobins, die zum Teil durch Dialyse abgetrennt und im Dialysat als Folin-Lowry-positives Material erfaßt werden. Die zu bestimmende Enzymaktivität wird mit der Aktivität eines Bezugsenzyms (Schweinepepsinogen) verglichen (6).

Apparatur:

Das System setzt sich aus einer Kombination von Auto-Analyzer-Elementen zusammen.

Fließdiagramm:

Das Fließdiagramm ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

Reagenzien:

1) Ca.0,2n HCl
2) Hämoglobin-Lösung 0,5 g / 100 ml
   Herstellung: 15 g Hämoglobin [Hemoglobin Substrate (Rind) Salt free, Nr. 2382; Mann Res.Lab. New York, N.Y.]

werden mit etwa 500 ml bidestilliertem Wasser vorsichtig angerührt und auf 3,0 l mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die Lösung auf einer Nutsche abgesaugt (Filter Schleicher & Schüll Nr. 595).

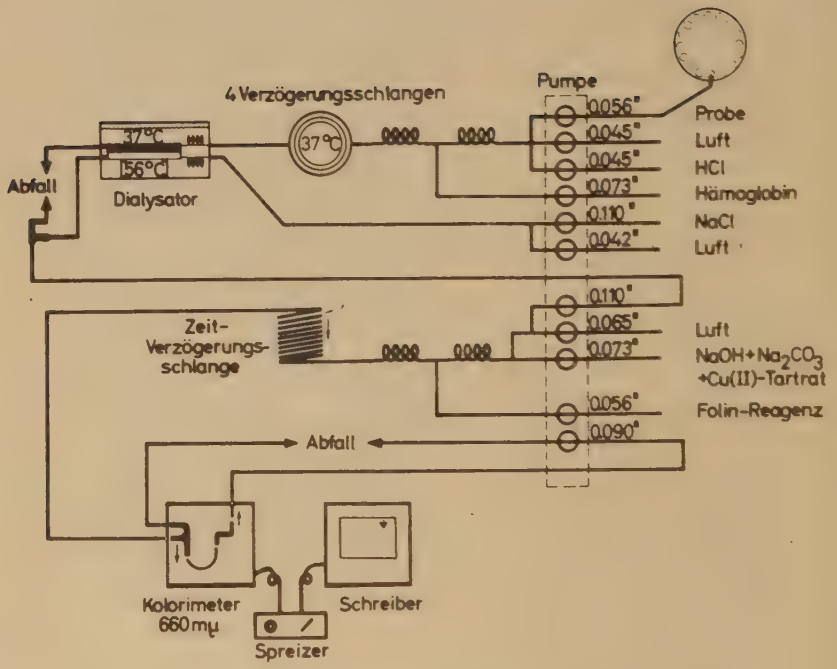

Abb. 17: Das Fließdiagramm der Bestimmung der sauren proteolytischen Aktivität im Eluat der gelchromatographischen Trennung

Anschließend wird die Lösung bei 5 - 10°C für 30 Minuten bei etwa 1300 g zentrifugiert. Nach Dekantieren wird die Lösung bei + 4°C aufbewahrt und ist dort 24 Stunden haltbar.

3) Physiologische Kochsalzlösung

4) Alkalische Cu-Tartrat-Lösung

Herstellung: Lösung I:

0,75 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ p.A. / 300 ml H_2O

Lösung II:

2,25 g K-Na-Tartrat $\cdot$ 4 H_2O p.A. und

60 g Na_2CO_3 wasserfrei p.A. werden mit 0,6n NaOH auf 2700 ml aufgefüllt.

Jeweils 100 ml der Lösung I werden zu 900 ml der Lösung II zugesetzt und ergeben so die "Alkalische Cu-Tartrat-Lösung".

5) Folin-Reagenz

Das nach Vorschrift von Folin-Cioalteu hergestellte Reagenz wird 1 : 3 mit H_2O verdünnt.

Filter: 660 nm

pH-Wert:

Der pH-Wert des Reaktionsgemisches resultiert bei vorgegebener Wasserstoffionenkonzentration und Ionenstärke der Probenflüssigkeit aus der Konzentration der HCl, die dem System zugeführt wird. Im Intervall zwischen zwei Aspirationen von Proben muß durch den für die Luftzufuhr vorgesehenen Pumpenschlauch ein geeigneter Na-acetat-Essigsäure-Puffer von gleichem pH aspiriert werden, um eine gleiche Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen.

Eichlösungen:

Pepsin (aus Schweinemagen)
(Mann Research Laboratories Inc. New York, Cat.Nr. 2095)

0,1 - 100 µg Pepsin/ml 0,1m Na-acetat-Essigsäure-Puffer, pH 5,6

Empfindlichkeit:

In diesem Testsystem können noch Pepsinkonzentrationen von 0,15 µg/ml erfaßt werden.

Proben:

Weder im Bezugssystem noch in den Proben, die analysiert werden sollen, darf bei 56°C dialysables Folin-Lowry-positives Material enthalten sein. Andernfalls ist eine Leerwertbestimmung notwendig. Sie erfolgt im gleichen System, wobei das Substrat durch 0,9 %ige NaCl-Lösung ersetzt wird; um in dem veränderten Inkubationsstrom den gleichen pH-Wert zu erhalten, muß gleichzeitig die HCl-Konzentration herabgesetzt werden. Die Leerwerte werden auf Tyrosin bezogen. Diese Tyrosin-Äquivalente werden von den Reaktionsproduktkonzentrationen, die ebenfalls in Tyrosin-Äquivalenten gemessen werden, subtrahiert.

Arbeitsweise:

Der Probenehmer wird auf 40/h eingestellt und mit einer alternierenden Reihe von Proben und 0,1m Na-acetat-Essigsäure-Puffer pH 5,6 besetzt.

Eichkurven:

Eine Eichkurve für Pepsin wird in Abbildung 18 wiedergegeben.

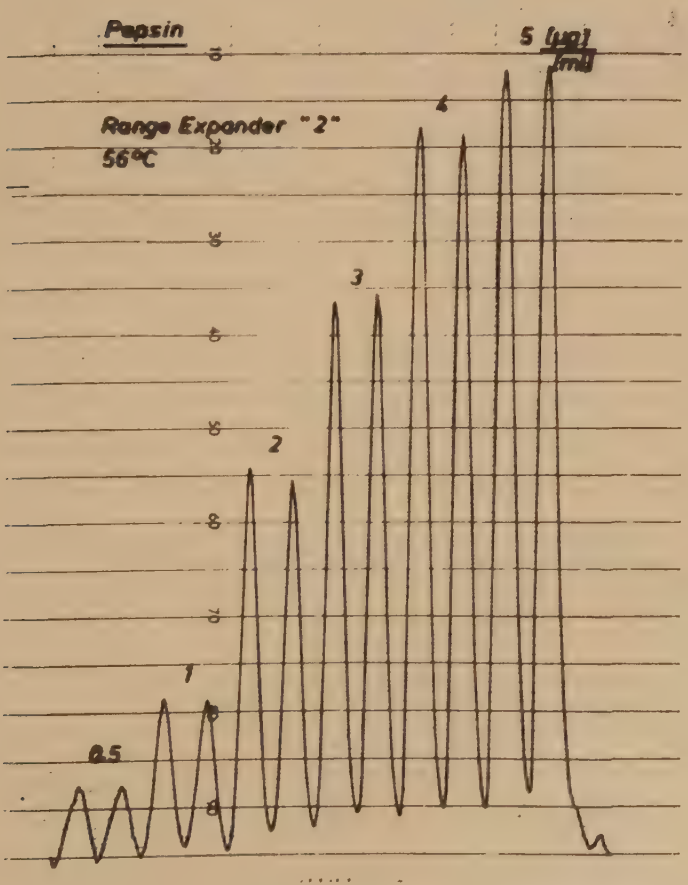

Abb. 18: Eine Eichkurve mit Pepsin als Vergleichsenzym

b) **Die Aufbereitung des Gels und die Beschickung der Chromatographiesäule**

In 500 ml einer 5m Harnstofflösung werden 8,1 g Sephadex G 200 in kleinen Mengen eingerührt (19). Die Rührzeit beträgt 60 Minuten. Das gequollene Gel wird von seinem Quellungsmittel mit Hilfe einer Nutsche (Filterpapier Nr. 597, Durchmesser 12,5 cm) getrennt. Danach wird das Gel portionsweise mit ca. 2 l quarzdestilliertem Wasser und 1 l 0,1m Na-acetat-puffer (pH 5,6), der 1 molar an NaCl ist, nachgespült.

Das so aufbereitete Gelmaterial wird in ein Becherglas gegeben und mit ca. 500 ml 0,1m Na-acetat-puffer, 1 molar an Natriumchlorid, 2 Stunden gerührt. Im nächsten Schritt läßt man das Gelmaterial 30 Minuten absitzen und pipettiert den überstehenden Puffer ab. Auf diese Weise werden extrem kleine Gelpartikel entfernt. Dann wird am Wasserstrahlvakuum 4 - 5 Minuten lang das Gel entgast. Man läßt das so behandelte Gel 24 Stunden lang in einem Meßzylinder absitzen und saugt die überstehende Pufferschicht scharf ab. Das Gel wird nun vorsichtig in die Chromatographie-Säule überführt und mit Elutionspuffer durchströmt. Die Säule wird mit dem Fraktionssammler (LKB 3400B Radi-rac Firma LKB-Producter AB, Stockholm) kombiniert.

c) Die Gelchromatographietechnik

Methode:

Die 75 cm lange und 1,5 cm breite Sephadex G 200 - Gel-Säule wird von einer eiweißhaltigen Probe durchströmt. Das Eluat wird über einen Siphon mit dem Fraktionssammler aufgefangen. Die Eiweißkonzentration der einzelnen Fraktionen wird mit der automatisierten Modifikation der Folin-Lowry-Methode gemessen.

Apparatur:

Die Anlage setzt sich aus dem Fraktionssammler (s.o.) und aus einer Chromatographie-Säule (Säule: nach eigenem Entwurf) zusammen.

Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 19 wiedergegeben.

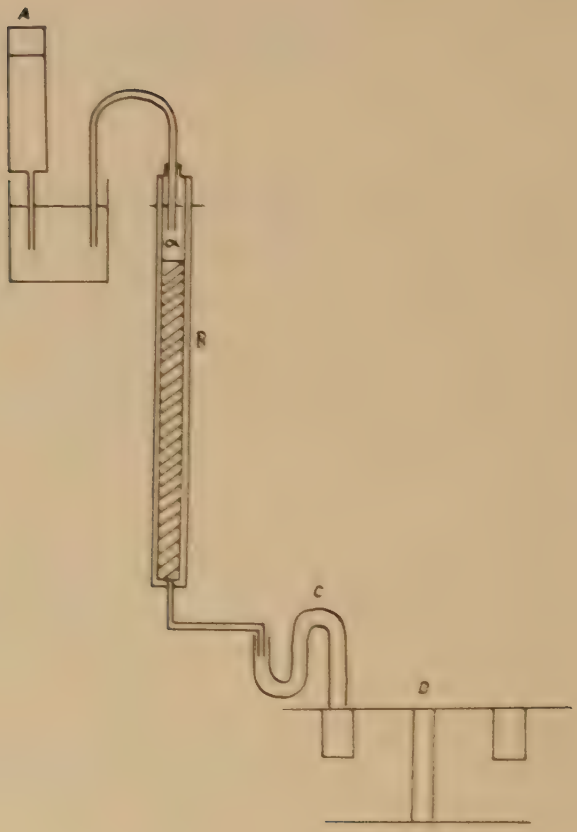

Abbildung 19:

A = Vorratsgefaß mit 0,1m Na-acetat-puffer, 1m NaCl (pH 5,6)

B = Chromatographie-Säule, die mit einem Kühlmantel umgeben ist. Sie hat eine Länge von 80 cm und eine lichte Weite von 1,5 cm.

C = Siphon. Er gewährleistet annähernd gleiche Volumina der Einzelfraktionen

D = Fraktionssammler

Temperatur der Säule:
Die Säule ist mit einem Kühlmantel umgeben. Während der gelchromatographischen Untersuchung wird die Temperatur bei $5^{o}C \pm 1^{o}C$ gehalten.

Zeitdauer der Chromatographie:
Für ein Chromatogramm werden vom Auftragen der Probe bis zur völligen Elution ca. 28 - 30 Stunden benötigt. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 3,1 $cm^3/cm^2 \cdot h$.

Das Volumen oder die Auslaufmenge einer Fraktion im Eluat:
Um eine möglichst genaue Bestimmung des Volumens zu erhalten, werden die einzelnen in dem Fraktionssammler aufgefangenen Fraktionen gewogen. Das Gewicht der Einzelfraktion beträgt 2 - 3 g. Die einzelnen Fraktionen, die mit Parafilm (Division of american can company, Neenah, Wisconsin) verschlossen sind, werden bis zur Messung bei + $4^{o}C$ aufbewahrt. Die Angabe der Fraktionen in Gramm sind dann möglich, wenn die Dichte des Eluates annähernd konstant und gleich dem des Elutionspuffers ist. Es gilt dann:

$$m = \varrho_{Lsg} \cdot V$$

m = Masse einer Fraktion
ϱ_{Lsg} = Dichte des Eluates
V = Volumen einer Fraktion

Die Dichte des Eluates (ϱ_{Lsg}) hängt sowohl von der Dichte des Elutionspuffers (ϱ_{LM}) als auch von der Eiweißkonzentration (C_p) in Gramm pro Milliliter ab.

Beide Faktoren werden bekanntlich durch die Gleichung

$$\varrho_{Lsg} = \varrho_{LM} + (1 - \bar{V}_1 \cdot \varrho_{LM}) \cdot c_p \qquad 37$$

erfaßt.

c_p = Konzentration des Proteins in g/cm^3

$\bar{V}_1$ = scheinbares spezifisches Volumen des Proteins; etwa gleich dem partiellen spezifischen Volumen des Proteins.

ϱ_{Lsg} und ϱ_{LM} = die Dichten von Eluat und Elutionspuffer.

Eine Abschätzung zeigt, daß der Einfluß der Proteinkonzentration unter den hier vorliegenden Elutionsbedingungen auf die Dichte des Eluates vernachlässigbar ist.

$$\varrho_{Lsg} = 1{,}039 + (1 - 0{,}75 \cdot 1{,}039) \cdot 10^{-4}$$
$$\varrho_{Lsg} = 1{,}039$$

1,039 = die experimentell bestimmbare Dichte des Elutionspuffers

0,75 = partielles spezifisches Volumen des Proteins (STUART, H.A.: Das Makromolekül in Lösungen II)

10^{-4} = die Konzentration des Proteins (g/ml) entspricht 100 µg/ml. Dies ist eine Proteinkonzentration, wie sie bei den durchgeführten Fraktionierungen vorliegt.

Somit kann das Volumen einer Fraktion durch ihr Gewicht ersetzt werden.

d) Das Aufgeben der Probe auf die Säule

Über ein Hebersystem wird der Säule ständig Puffer zugeführt, sodaß sie nicht trockenläuft.

Wenn man eine Probe einpipettieren will, entfernt man zuerst das Vorratsgefäß (siehe Abb. 19); dann sickert die über der Säule stehende Pufferschicht (α) in die Gelmasse ein. Anschließend wird, ohne die Gelmasse aufzuwirbeln, mit einer Pipette die zu untersuchende Eiweißprobe aufgetragen. Nachdem diese in die Säule eingedrungen ist, wird das Vorratsgefäß mit dem Puffer wieder angeschlossen.

Die zu gewinnenden Fraktionen des Eluats betragen 2 - 3 ml. Dieses Volumen kann nicht weiter reduziert werden, da die oben erwähnten automatisierten Methoden ein kleineres Probenvolumen als 2 ml nicht mehr zulassen.

e) Die Eichung der Säule

Zur Ermittlung der Abhängigkeit des Elutionsvolumens bzw. der Auslaufmenge in Gramm vom Molekulargewicht werden eine Reihe von Proteinen bekannten Molekulargewichtes durch die Säule geschickt. Durch dieses Vorgehen erhält man die Beziehung $V_e = f(M)$.

Im einzelnen wird folgendermaßen verfahren:

Von jedem der zu untersuchenden Proteine wird eine Lösung hergestellt, die 1000 µg/ml enthält. Auf die Säule werden 2 ml, also eine Menge von 2 mg Eiweiß aufgetragen.

Folgende Proteine werden verwendet:

Pepsinogen (aus Schweinemagen)
(Mann Research Laboratories Inc. New York, Cat.Nr. 725)

Pepsin (aus Schweinemagen)
(Mann Research Laboratories Inc. New York, Cat.Nr. 2095)

Ribonuklease
(Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Nr. 34390)

Albumin (aus Rinderserum)
(Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Nr. 11920)

Aldolase (aus Kaninchenmuskel)
(Mann Research Laboratories Inc. New York, Cat.Nr. 4322)

Katalase (aus Rinderleber)
(Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Nr. 26900)

Cytochrom C (aus Pferdeherz)
(Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Nr. 18020)

Ovalbumin (aus Hühnerei)
(Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Nr. 11840)

Arbeitsweise:

Es werden aliquote Teile der gewogenen Fraktionen des Eluates zur Messung gebracht : Der Probennehmer wird auf 40/h eingestellt und mit einer alternierenden Reihe von Proben und 0,1m Na-acetat-puffer pH 5,6 besetzt. Nach je 10 Proben werden 2 Leerwerte und 1 "Signal" gesetzt (siehe Abb. 36 + 37).

Eichkurven:

In der Abbildung 20 ist eine Eichkurve für Ovalbumin und ein Verteilungschromatogramm wiedergegeben.

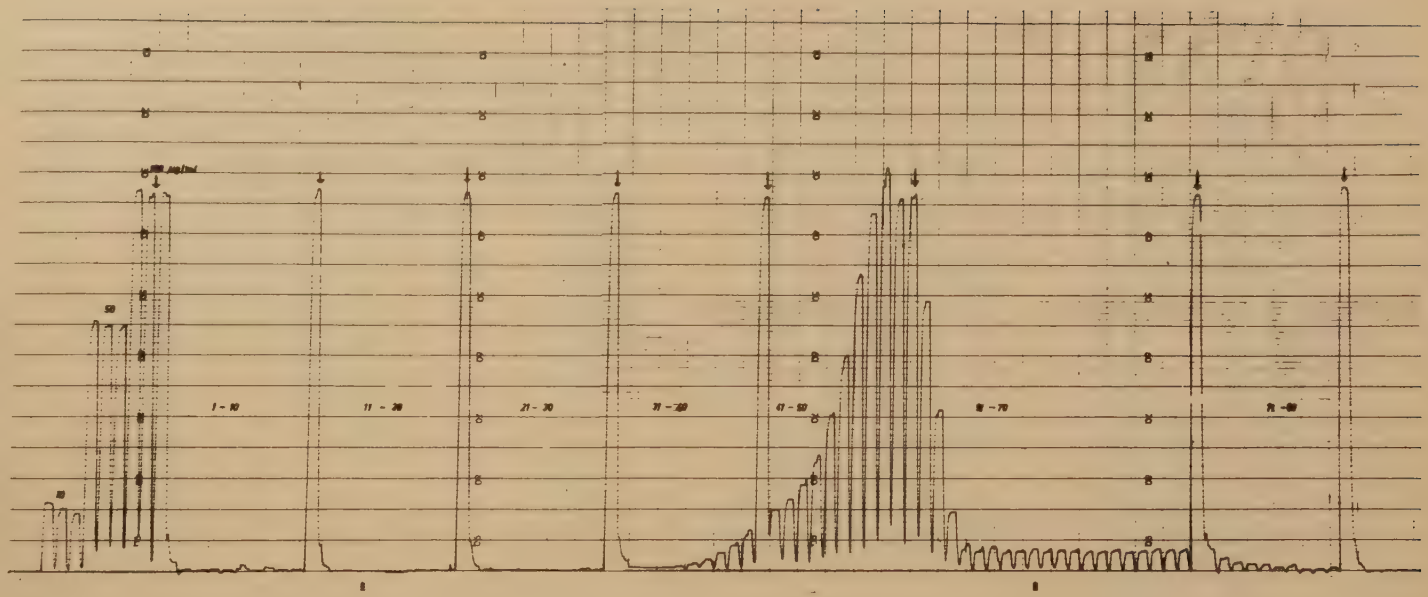

Abb. 20: Eichkurve und Verteilungschromatogramm von Ovalbumin

Die Elutionsdiagramme der verschiedenen Proteine sind für das Sephadex-Gel G 100 (Abb. 21) und G 200 (Abb.22) graphisch dargestellt. Das Elutionsvolumen oder die Auslaufmenge eines Proteins entspricht dem Maximum seiner Elutionskurve. Aus diesen Messungen läßt sich der geforderte Zusammenhang $V_e = f(M)$ ermitteln. Die Abhängigkeit des Logarithmus des Molekulargewichtes des betreffenden Proteins von seiner Auslaufmenge wird in den folgenden Darstellungen wiedergegeben; sie sind zugleich die Eichgeraden für die Sephadex-Gele G 100 (Abb. 23) und G 200 (Abb. 24).

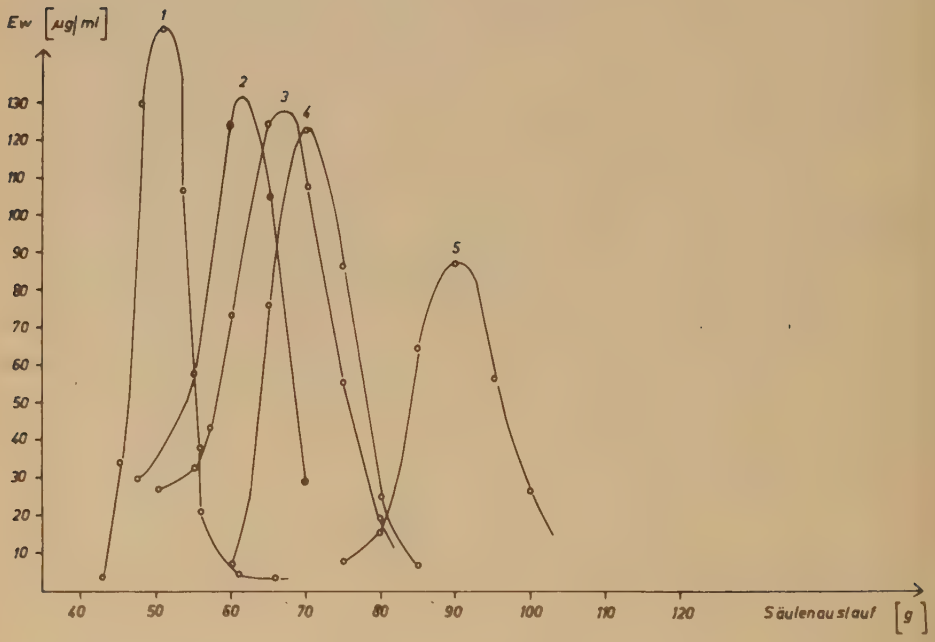

Abb. 21: Die Elutionsdiagramme der verschiedenen Proteine gemessen an Sephadex G 100.

Ordinate: Proteinkonzentration in µg/ml der entsprechenden Eichlösung

Abszisse: Die Menge des Eluates in Gramm

Die durch die Ziffern gekennzeichneten Elutionsmaxima und die dazugehörigen Substanzen mit ihrem Molekulargewicht werden in Tabelle 6 wiedergegeben.

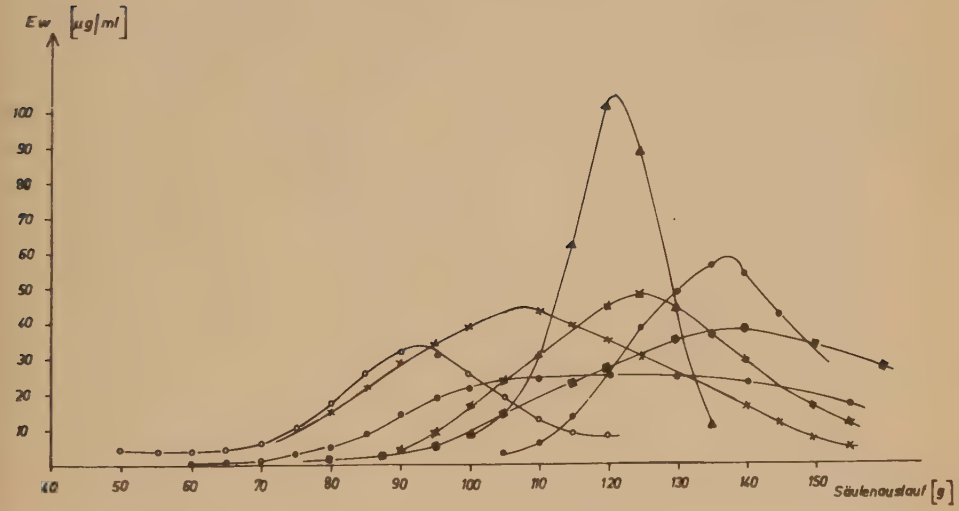

Abb. 22: Die Elutionsdiagramme der verschiedenen Proteine gemessen an Sephadex G 200

Ordinate: Proteinkonzentration in µg/ml der entsprechenden Eichlösung.

Abszisse: Die Menge des Eluates in Gramm.

Die durch die Symbole gekennzeichneten Elutionsmaxima und die dazugehörigen Substanzen mit ihrem Molekulargewicht werden in Tabelle 7 wiedergegeben.

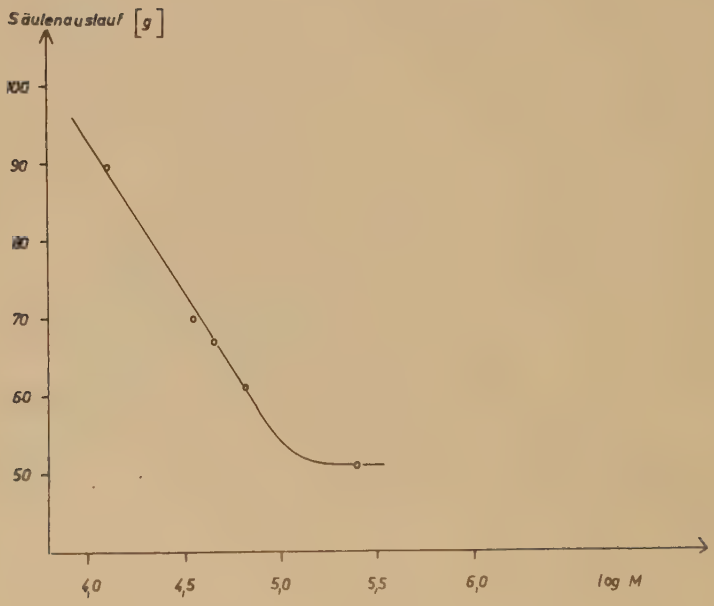

Abb. 23: Die Eichgerade für Sephadex G 100

Ordinate: Säulenauslauf in Gramm

Abszisse: Logarithmen der Molekulargewichte der verwendeten Testproteine (siehe Tabelle 6)

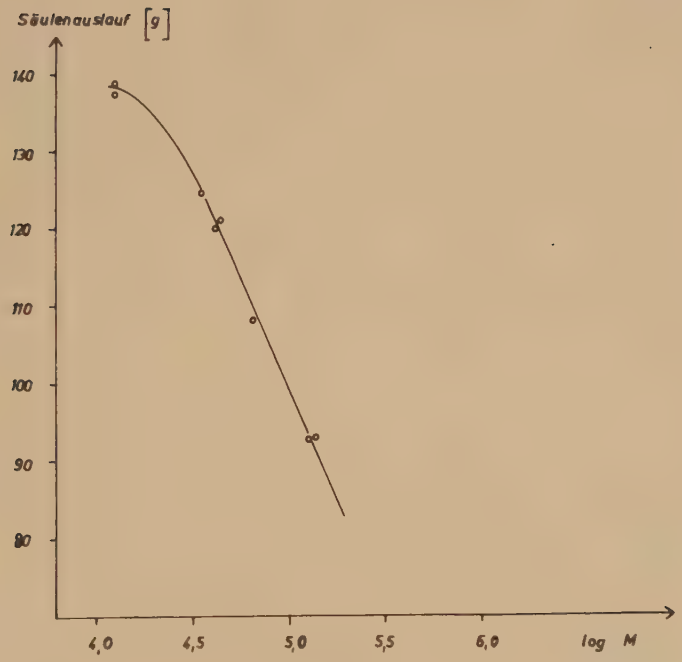

Abb. 24: Die Eichgerade für Sephadex G 200

Ordinate: Säulenauslauf in Gramm

Abszisse: Logarithmen der Molekulargewichte der verwendeten Testproteine (siehe Tabelle 7)

In den Tabellen 6 u. 7 sind noch einmal die Angaben zusammengefaßt, die den Abb. 23 u. 24 zugrunde liegen.

Eiweiß	Mol.Gew.	log M.	$\frac{f}{f_o}$	v_e (g)	$\bar{v}_e$ (g)		
Albumin	67000	4,8261	1.30	62,0 60,5	61,25 ± 1,061	A	2
Schw.-pepsin	35700	4,5527	1.08	67,8 73,4	70,1 ± 3,253	B	4
Oval-bumin	45000	4,6532	1.16	69,4 64,5	66,9 ± 3,536	C	3
Ribo-nuklease	13000	4,1139	1.04	90,5 89,0	89,75 ± 1,061	D	5
Katalase	248000	5,3945		51,1	51,1	H	1

Tabelle 6:

Die Molekulargewichte der globulären Testproteine mit ihrem Reibungsverhältnis $\frac{f}{f_o}$ und die dazugehörigen Auslaufmengen (v_e), ihre Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen. - Die Ziffern bezeichnen die Elutionsmaxima der einzelnen Proteine (siehe Abb. 21). - Das Gelmaterial ist Sephadex G 100.

Eiweiß	Mol.Gew.	log M.	$\frac{f}{f_o}$	v_e (g)	$\bar{v}_e$ (g)		
Albumin	67000	4,8261	1.30	109,0 107,0	108,0 ± 1,415	A	×
Aldolase	147000	5,1673		96,0 96,5 88,0	93,16 ± 4,482	E	○
Cyto-chrom C	13000	4,1139	1.00	139,5 135,5	137,5 ± 2,829	F	●
Oval-bumin	45000	4,6532	1.16	120,0 122,0	121,0 ± 1,415	C	▲
Schw. pepsin	35700	4,5527	1.08	125,0 127,5 121,5	124,66 ± 3,014	B	✖
Schw. pepsi-nogen	42000	4,6232		120,0	120,0	G	⊙
Ribo-nuklease	13000	4,1139	1.04	138,0 140,0	139,0 ± 1,415	D	■

Tabelle 7:

Die Molekulargewichte der globulären Testproteine mit ihrem Reibungsverhältnis ($\frac{f}{f_o}$) und die dazugehörigen Auslaufmengen (v_e), ihre Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen. - Die Symbole bezeichnen die Elutionsmaxima der einzelnen Proteine (siehe Abb. 22). - Das Gelmaterial ist Sephadex G 200.

Die in den Tabellen 6 und 7 angegebenen Molekulargewichte bzw. ihre Reibungsverhältnisse wurden folgenden Handbüchern entnommen:

A: RAUEN, H.M., Biochem. Taschenbuch 1, 785 (1964)

B: RAUEN, H.M., Biochem. Taschenbuch 1, 772 (1964)

C: RAPOPORT, S.M., Medizin. Biochemie, 101 (1965)

D: RAUEN, H.M., Biochem. Taschenbuch 1, 770 (1964)

E: DIXON, M., WEBB, E.C., Enzymes, 454 (1964)

F: RAUEN, H.M., Biochem. Taschenbuch 1, 582 (1964)

G: RAUEN, H.M., Biochem. Taschenbuch 1, 772 (1964)

H: DIXON, M, WEBB, E.C., Enzymes, 45 (1964)

$\frac{f}{f_o}$: EDSALL, J.T., NEVRATH, H., BALLEY, K.:
The Proteins 1 (B), 634, Academie Press New York (1953).

f) Die Aufbereitung des Magensaftes und des Harnes

1. Der Magensaft

5 - 10 ml saurer Magensaft eines gesunden Probanden werden filtriert. Das Filtrat wird mit Hilfe eines Dextar-Schlauches 12 Stunden lang bei + 4°C gegen den Puffer dialysiert. 2 ml dieses Dialysats werden auf die Säule gegeben.

2. Das Harnproteinkonzentrat

30 ml eines Harnproteinkonzentrates eines gesunden Probanden werden mit Hilfe eines Dextar-Schlauches 12 Stunden lang bei + 4°C gegen den Puffer dialysiert. Auch von diesem Dialysat werden 2 ml als Probe auf die Säule gebracht.

Die Herstellung des Harnproteinkonzentrates wurde in ausführlicher Weise an anderer Stelle (x) beschrieben.

(x): Ein automatisiertes Verfahren der Bestimmung der sauren proteolytischen Enzymaktivität des Harnes, Inaugural-Dissertation W. BROKATE, Universität des Saarlandes (1966).

g) Die experimentellen Ergebnisse der Gelchromatographie des Magensaftes und des Harnproteinkonzentrates

Es wurden 3 Messungen von Magensäften an G 100 (Abb. 25, 26, 27)

und 3 Messungen von Harnproteinkonzentraten an G 100 (Abb. 28, 29, 30),

sowie 3 Messungen von Magensäften an G 200 (Abb. 31, 32, 33)

und 3 Messungen von Harnproteinkonzentraten an G 200 (Abb. 34, 35, 36)

durchgeführt.

Dabei wurden der Eiweißanteil und der eigentliche Enzymanteil (Magenpepsin bzw. Uropepsinogen) gemessen. Es ergaben sich folgende Elutionsvolumina:

Die Elutionsvolumina (v_e) sind gemessen als Säulenauslauf (g)

für G 100:

Magensaft:

v_e - 74,5 (Abb. 25)
v_e - 75,0 (Abb. 26)
v_e - 75,0 (Abb. 27)

Harnproteinkonzentrat:

v_e - 67,5 (Abb. 28)
v_e - 71,0 (Abb. 29)
v_e - 66,5 (Abb. 30)

für G 200:

Magensaft: v_e - 126,5 (Abb. 31)

v_e - 129,5 (Abb. 32)

v_e - 127,5 (Abb. 33)

Harnproteinkonzentrat:

v_e - 123,5 (Abb. 34)

v_e - 123,5 (Abb. 35)

v_e - 120,7 (Abb. 36)

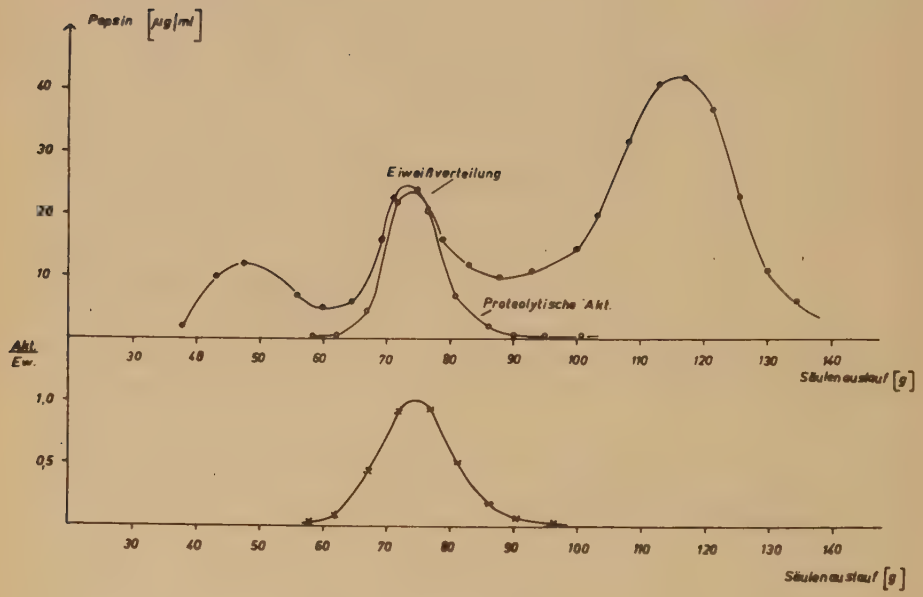

Abb. 25: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft gewonnen an Sephadex G 100.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml, wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

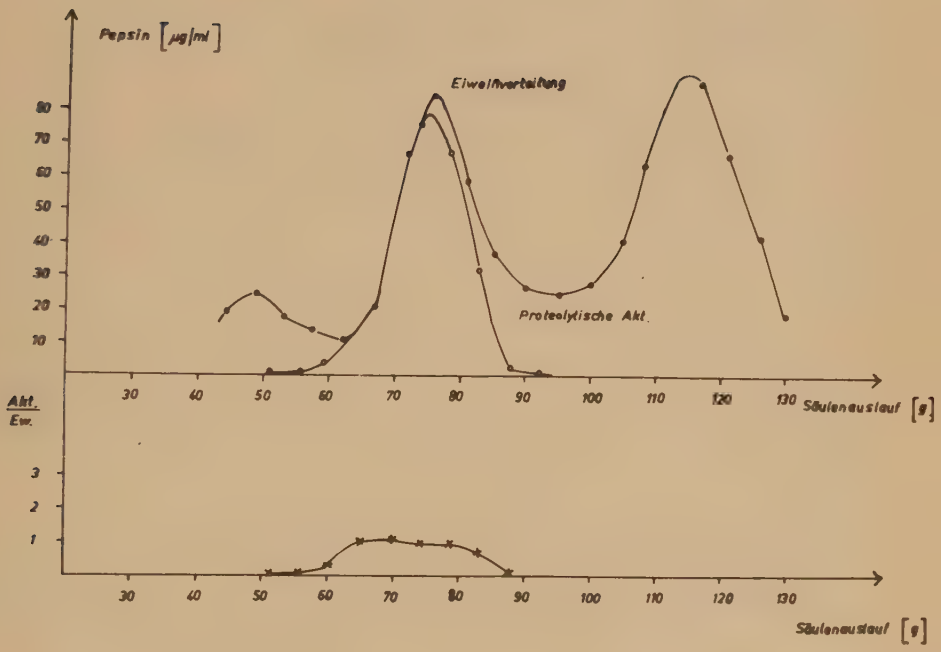

Abb. 26: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft, gewonnen an Sephadex G 100.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

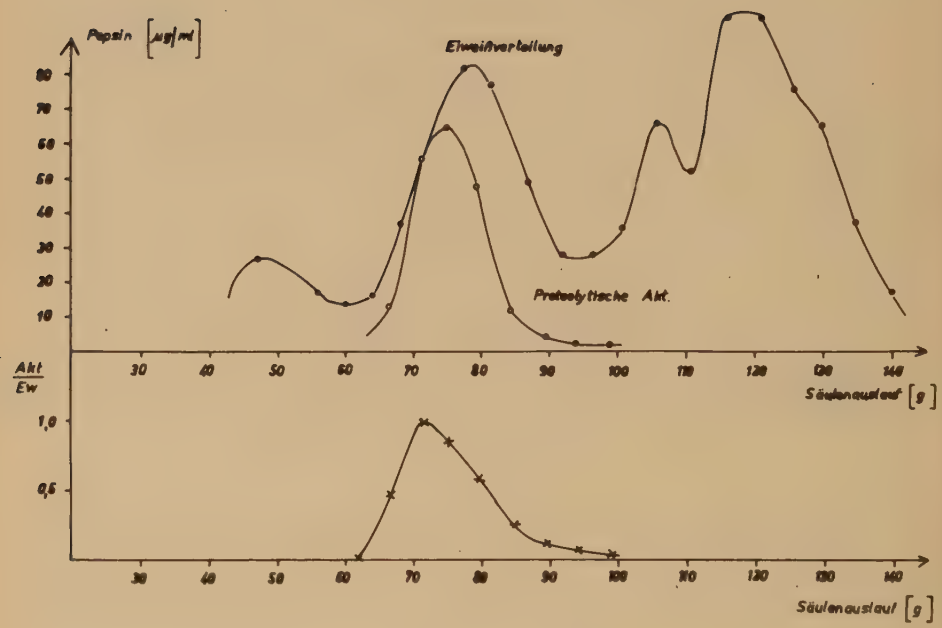

Abb. 27: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft, gewonnen an Sephadex G 100.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

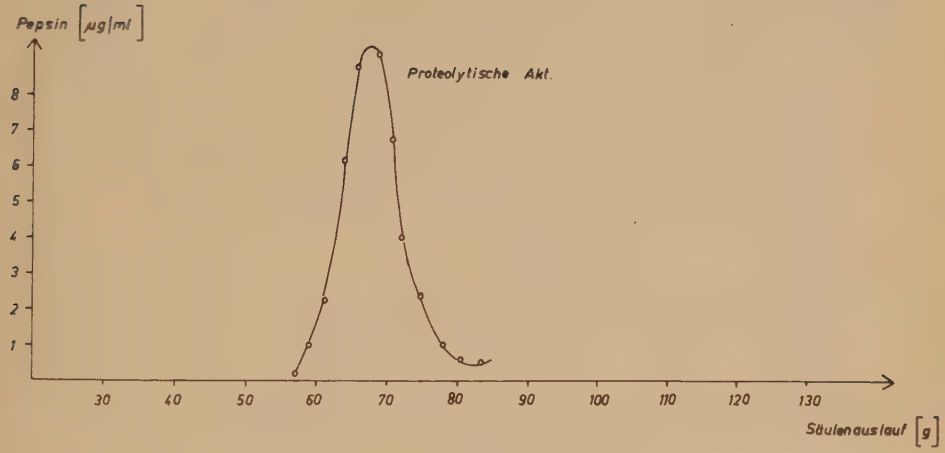

Abb. 28: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 100.

Die Ordinate stellt die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml, die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm dar.

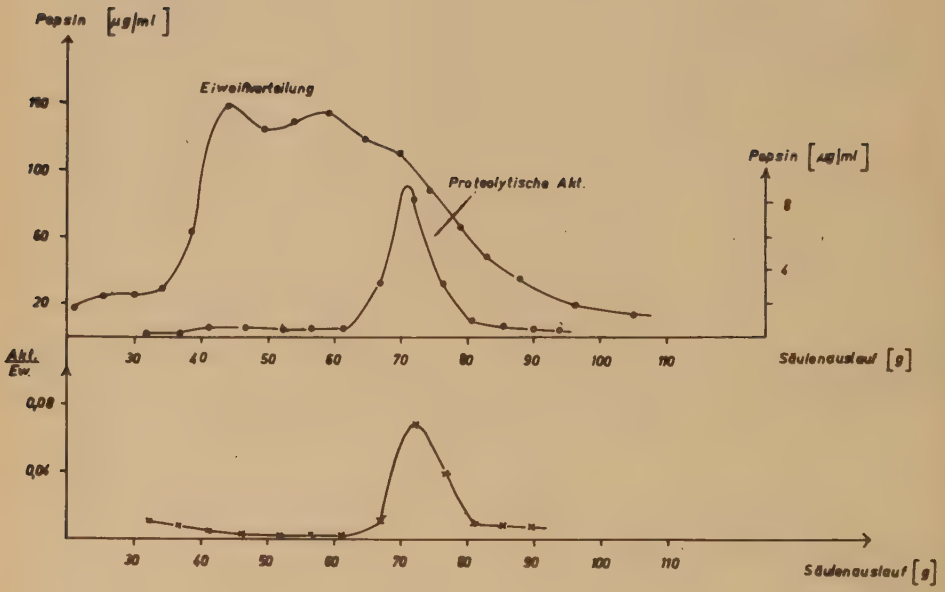

Abb. 29: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 100.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar; die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.

Die Abszisse stellt den Säulenauslauf in Gramm dar.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

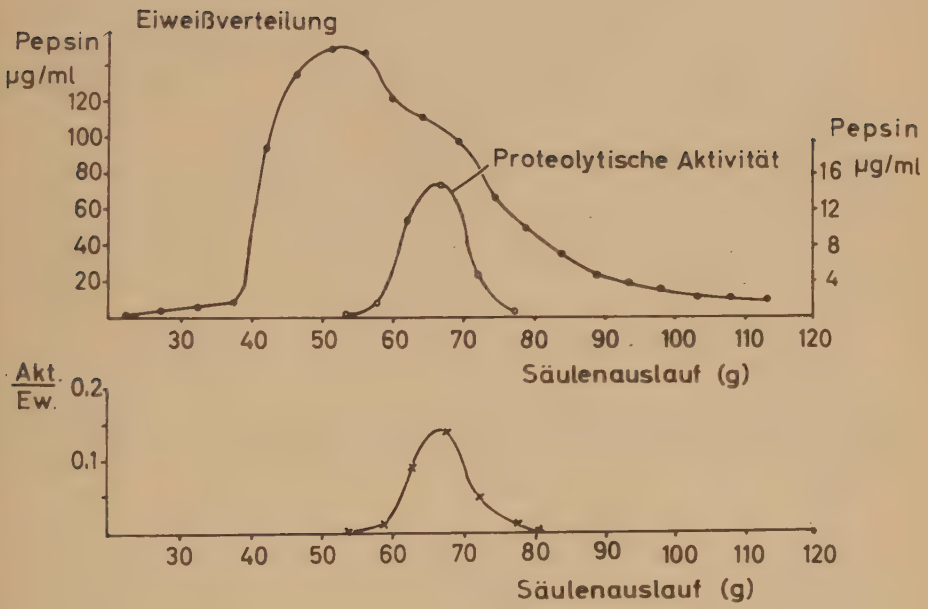

Abb. 30: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 100.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar; die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.

Die Abszisse stellt den Säulenauslauf in Gramm dar.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

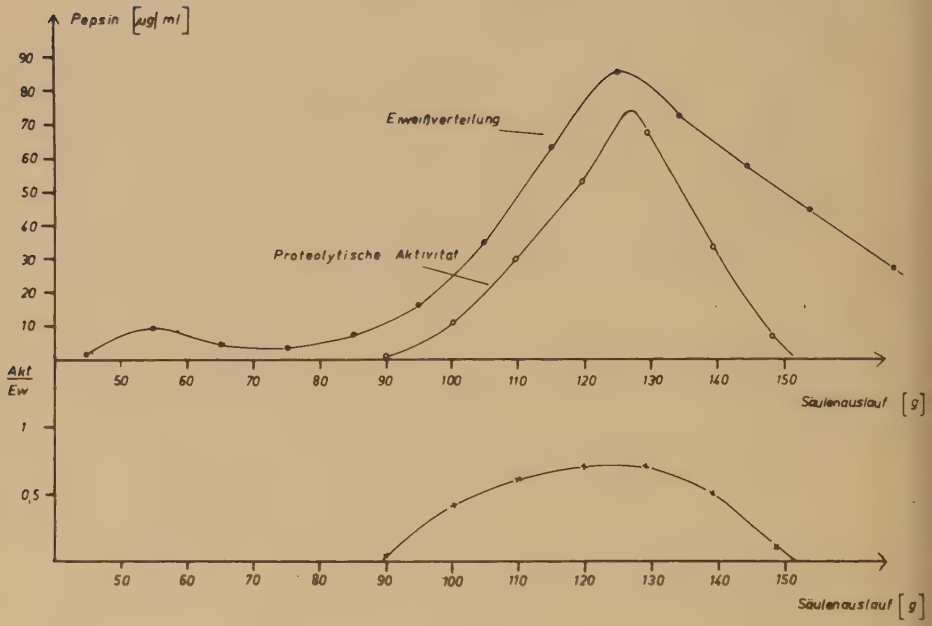

Abb. 31: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft, gewonnen an Sephadex G 200.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

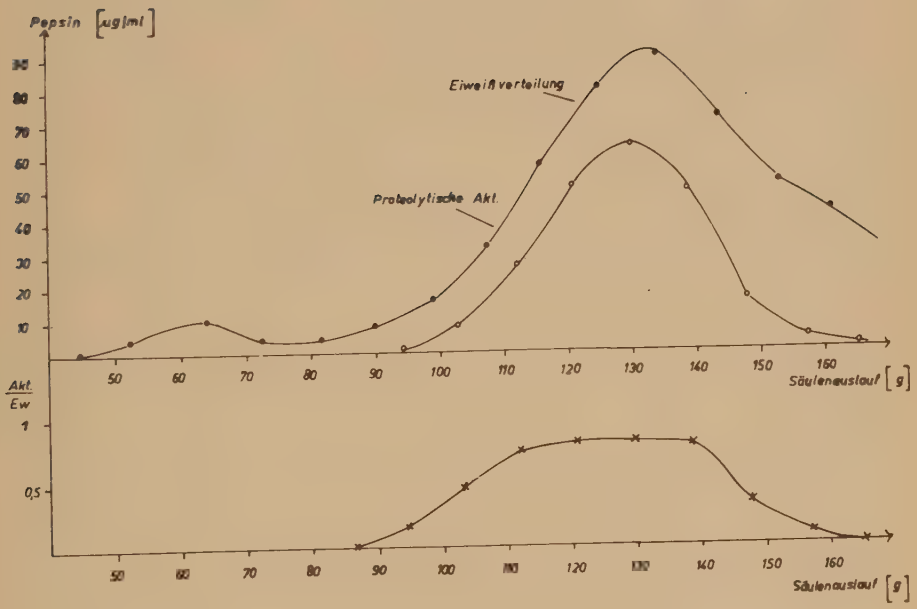

Abb. 32: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft, gewonnen an Sephadex G 200.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

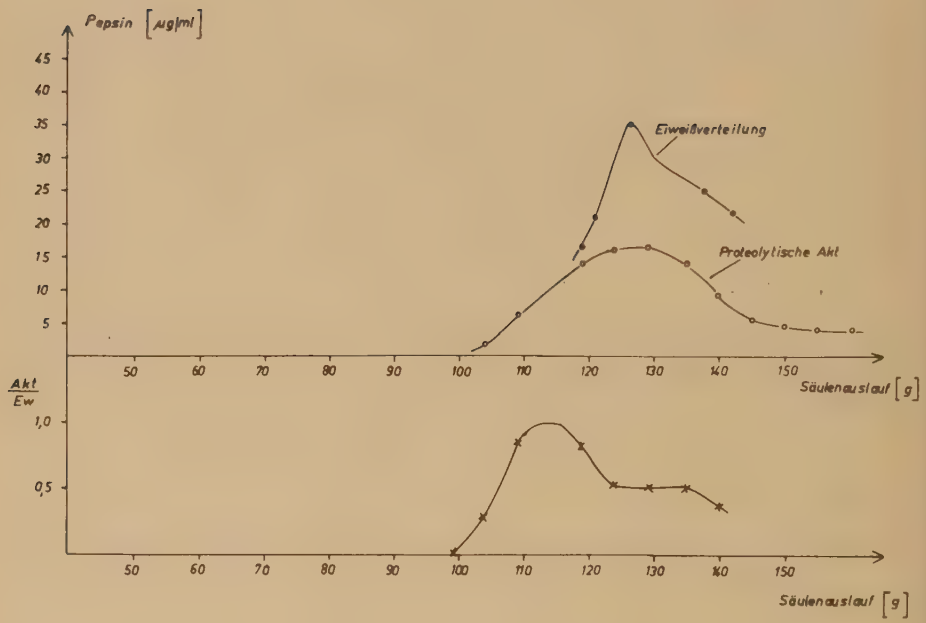

Abb. 33: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Magensaft, gewonnen an Sephadex G 200.

Die Ordinate gibt die EW-Konzentration sowie die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml wieder; die Abszisse den Säulenauslauf in Gramm.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse dargestellt.

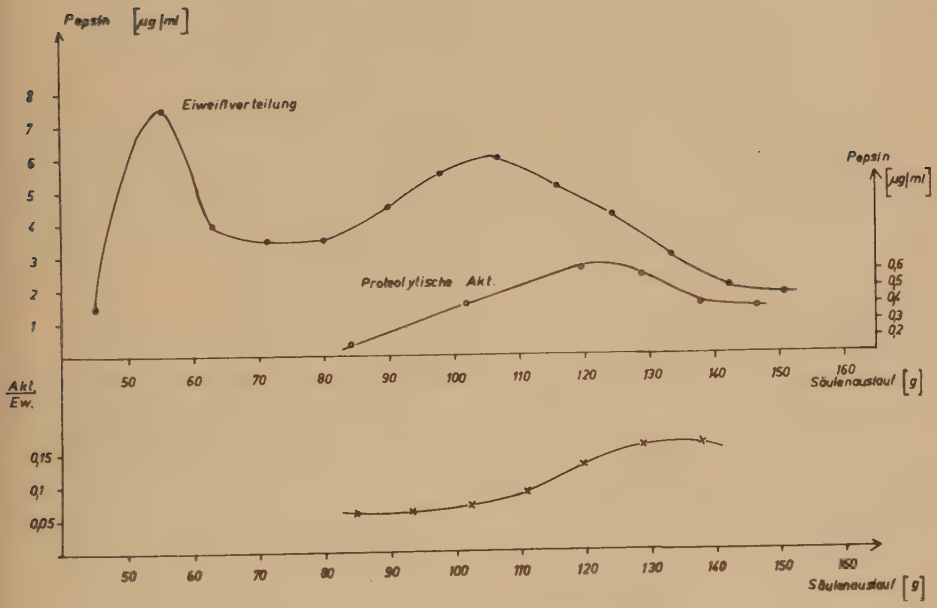

Abb. 34: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 200.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar; die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.
Die Abszisse stellt den Säulenauslauf in Gramm dar.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

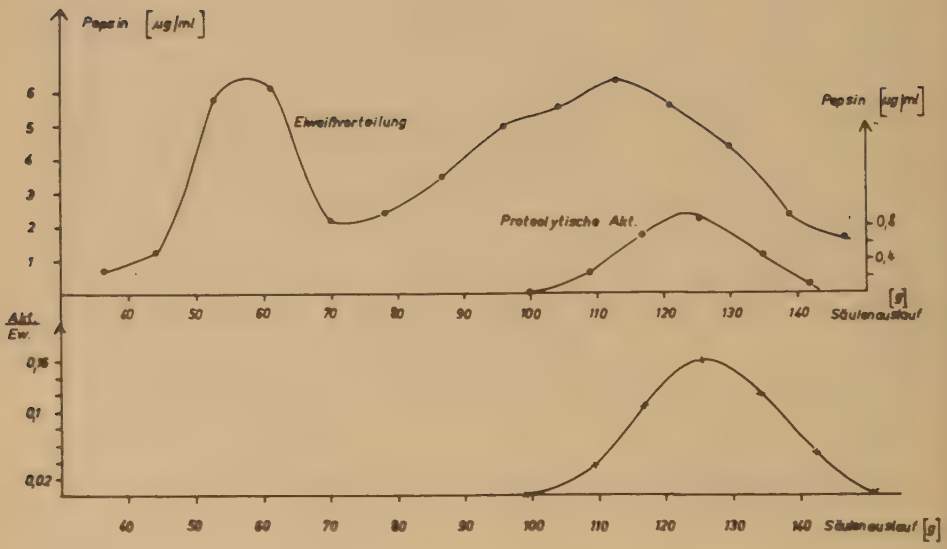

Abb. 35: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 200.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar; die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.

Die Abszisse stellt den Säulenauslauf in Gramm dar

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

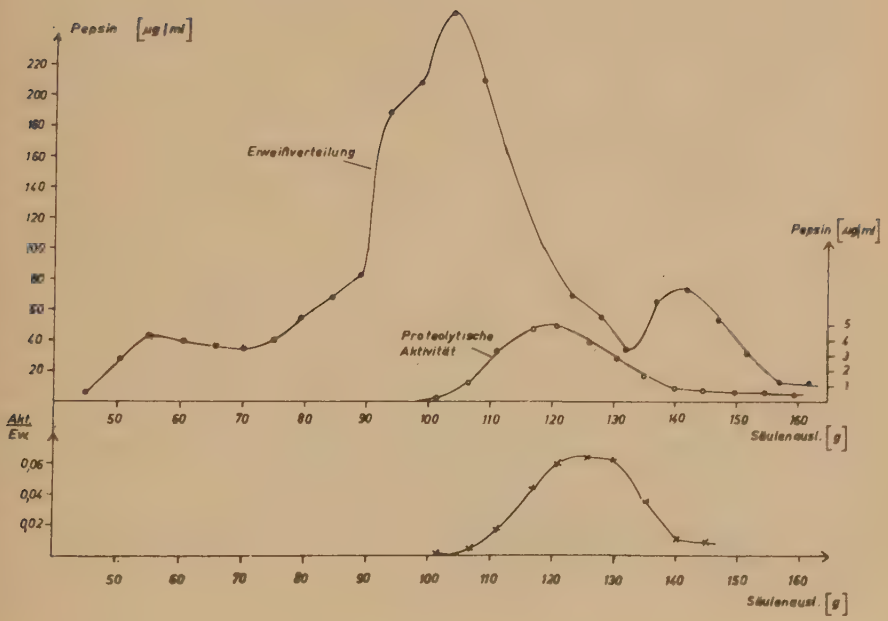

Abb. 36: Ein Gelchromatogramm von vorbehandeltem Harnproteinkonzentrat, gewonnen an Sephadex G 200.

Die linke Ordinate stellt die EW-Konzentration, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml dar; die rechte Ordinate die proteolytische Aktivität, gemessen in Äquivalenten Pepsin in µg pro ml.

Die Abszisse stellt den Säulenauslauf in Gramm dar.

In einer Unterdarstellung ist die spezifische Aktivität als Ordinate und der Säulenauslauf in Gramm als Abszisse wiedergegeben.

h) Original-Auto-Analyzer-Messung

Abschließend wird eine Original-Auto-Analyzer-Messung gezeigt, wie sie den oben dargestellten Chromatogrammen zugrunde liegt (Abb. 37a und 37b). Sie stellt eine kontinuierliche, automatische Registrierung einer Fraktionierung der sauren proteolytischen Aktivität des Magensaftes oder Harnproteinkonzentrates dar.

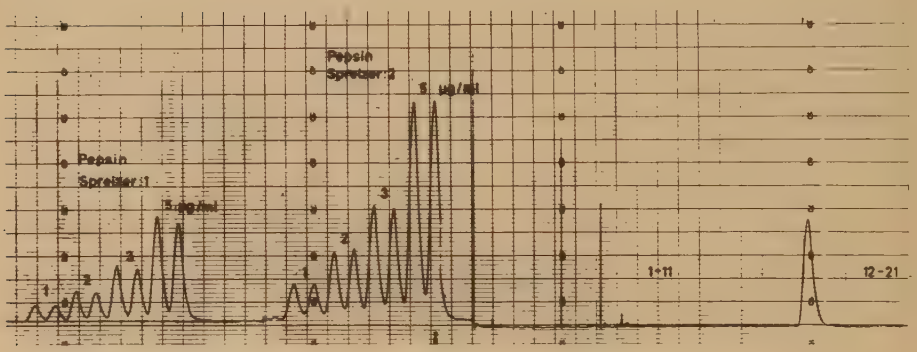

Abb. 37a: Die Eichkurve wurde in zwei Verstärkerstufen (Spreizer 1 und Spreizer 2) gemessen. Es folgen die einzelnen Fraktionen im Gelchromatogramm (1-11 und 12-22); dazwischen ist ein "Signal" gesetzt, um die Fraktionen voneinander zu trennen.

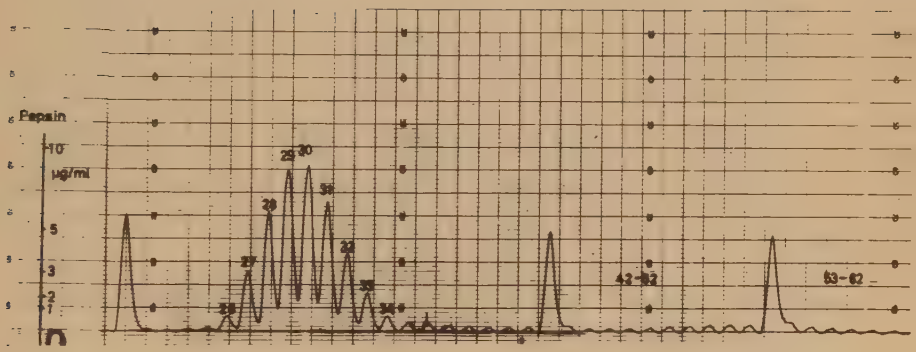

Abb. 37b: Die Fraktionen 26 bis 34 enthalten die saure proteolytische Aktivität. Die folgenden Fraktionen sind ohne wesentliche enzymatische Aktivität.

i) Die Ermittlung der Molekulargewichte des Magenpepsins und des Uropepsinogens aus den gemessenen Auslaufmengen und die Berechnung ihrer mittleren Molekulargewichte.

Die experimentell gefundenen Elutionsvolumina (v_e) der sauren, proteolytischen Aktivität des Magensaftes und des Harnproteinkonzentrates an Sephadex G 100 und G 200 sind in der folgenden Tabelle angegeben. Aus ihnen wurden die Mittelwerte ($\overline{v}_e$) und die dazugehörigen Standardabweichungen ($\Delta \overline{v}_e$) errechnet.

Versuchs-nummer	v_e	$\bar{v}_e$	$\Delta \bar{v}_e$
Gel: Sephadex G 100			
Magensaft:			
25	74,5		
26	75,o	74,83	o,289
27	75,o		
Harnproteinkonzentrat:			
28	67,5		
29	71,o	68,33	2,363
30	66,5		
Gel: Sephadex G 200			
Magensaft:			
31	126,5		
32	129,5	127,8	1,528
33	127,5		
Harnproteinkonzentrat:			
34	123,5		
35	123,5	122,6	1,616
36	120,7		

Tabelle 8: Die Elutionsvolumina (v_e) der sauren proteolytischen Aktivität der Magensäfte und der Harnproteinkonzentrate, ermittelt an den Gelen G 100 und G 200.

$\bar{v}_e$ = Mittelwerte der Elutionsvolumina

$\Delta \bar{v}_e$ = Standardabweichungen

Mit Hilfe der Auslaufmengen werden aus den Eichgeraden (Abb. 23 und 24) die Logarithmen der Molekulargewichte des Magenpepsins und des Uropepsinogens entnommen. Die auf diese Weise ermittelten Molekulargewichte mit den dazugehörigen Fehlerbereichen sind in der folgenden Tabelle angegeben.

	v_e	log M.	Mol.-Gewicht	mittl. Molgew.
Magensaft G 100	74,8 ± 0,29			
	d.h. 75,1	4,45	28200	28500
	- 74,5	4,46	28900	± 400
Harnprotein-konzentrat G 100	68,3 ± 2,4			
	d.h. 70,7	4,57	37200	41900
	- 65,9	4,67	46700	±4800
Magensaft G 200	127,8 ± 1,5			
	d.h. 129,3	4,46	28800	31000
	- 126,3	4,52	33100	±2200
Harnprotein-konzentrat G 200	122,6 ± 1,6			
	d.h. 124,2	4,56	36300	39000
	- 121,0	4,62	41700	±2700

Tabelle 9: Die Molekulargewichte des Magenpepsins und des Uropepsinogens und die dazugehörigen Fehlerbereiche, ermittelt durch Gelchromatographie an den Gelen Sephadex G 100 und G 200. Bei den Mittelungen der Molekulargewichte wurde sinngemäß auf- oder abgerundet.

In einer weiteren Tabelle sind die Mittelungen der Molekulargewichte, die sich aus den Messungen an den beiden verwendeten Gelen ergaben, aufgeführt:

	Geltyp	Molekulargewicht	mittleres Molekulargewicht
Magenpepsin	G 100 G 200	28500 31000	30000 ± 1500
Uropepsinogen	G 100 G 200	41900 39000	40500 ± 1500

Tab. 10: Das mittlere Molekulargewicht des Magenpepsins und des Uropepsinogens. Die angegebenen mittleren Molekulargewichte sind sinngemäß auf- oder abgerundet.

Ein Vergleich der Auslaufmengen von Schweinepepsinogen (Molekulargewicht 42000) und menschlichem Uropepsinogen (Tabelle 11) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung, d.h. eine Abweichung von weniger als 3 %. Somit läßt sich schon ohne Zuhilfenahme der Eichgeraden aussagen, daß das Molekulargewicht des menschlichen Uropepsinogens annähernd dem des Schweinepepsinogens gleich ist.

Protein	Geltyp	Auslaufmenge (g)
Schweinepepsinogen	G 200	v_e = 120,0
Uropepsinogen	G 200	v_e = 122,6 ± 1,6

Tab. 11: Verteilungschromatographischer Vergleich von menschlichem Uropepsinogen und Schweinepepsinogen.

E DISKUSSION

Enzyme in ungereinigtem Zustand lassen sich in ihren molekularen Eigenschaften in einfacher Weise u.a. durch drei Verfahren annähernd charakterisieren:

1) Die Ionenaustauscherchromatographie
2) Die Gelchromatographie
3) Die Stärkegelelektrophorese.

Die Untersuchungen des Uropepsinogens mit Hilfe der Ionenaustauschermethode wurde von SEIJFFERS et al. (3) und LEPPLA et al. (4) durchgeführt. Beide Untersucher konnten zeigen, daß das Uropepsinogen unter den gegebenen Versuchsbedingungen heterogen ist; es besteht aus mindestens drei Enzymaktivitäten, die sich an den hydrophilen Ionenaustauschern DEAE Sephadex und DEAE Cellulose trennen lassen. Die verwendeten Ionenaustauscher sind Anionenaustauscher; die einzelnen Komponenten des Uropepsinogens müssen somit als Anionen unter den Versuchsbedingungen vorliegen. Die aktiven Fraktionen werden von den Ionenaustauschern durch bestimmte NaCl-Konzentrationen abgelöst, die sich durch steigende Konzentrationen unterscheiden. Aus diesem experimentellen Verhalten kann geschlossen werden, daß Uropepsinogen aus Proteinanionen verschiedener Ladungsverteilung besteht.

Die nächste Frage, die sich aufdrängt, ist die nach der molekularen Einheitlichkeit des Proteins. Zur Beantwortung dieser Frage stehen bei Vorliegen ungereinigter Enzyme nur wenige Verfahren zur Verfügung. Eines davon ist die Gelchromatographie. Gelchromatographische Untersuchungen unter der Variation der Harnproteinkonzentrate, des pH-Wertes und der Ionenstärke des Elutionspuffers geben Auskunft über mögliche Aggregation bzw. Dissoziation der sauren proteolytischen Aktivität des Harnes. Solche Untersuchungen, die erstmals in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben ein innerhalb des Trennvermögens des gelchromatographischen Verfahrens einheitliches Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 40500. Aus dem so ermittelten Molekulargewicht ist es möglich, den Äquivalentradius des Uropepsinogens zu errechnen. Der Äquivalentradius ist durch die Gleichung

$$r = \left[\frac{3 \cdot M \cdot \bar{V}_1}{4 \cdot \pi \cdot N_L} \right] \frac{1}{3} \qquad 38$$

gegeben.

M = Molekulargewicht des Proteins

$\bar{V}_1$ = partielles spezifisches Volumen des Proteins

N_L = Lohschmidt'sche Zahl.

Setzt man das Molekulargewicht des Uropepsinogens in Gleichung 38, so erhält man:

$$r = \left[\frac{3 \cdot 40500 \cdot 0{,}75}{4 \cdot 3{,}14 \cdot 6{,}02 \cdot 10^{23}} \right]^{1/3} \text{ cm}$$

$$r = 23 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$$

Das partielle spezifische Volumen des Proteins wurde in Übereinstimmung mit der Literatur

[STUART, H.A.: Das Makromolekül in Lösungen II, (1953)]

mit 0,75 cm^3/g angenommen.

Der Äquivalentradius des Uropepsinogens beträgt also 23 Å. Dieser Radius müßte auch der des Plasmapepsinogens sein.

Aus dem ermittelten Äquivalentradius ist eine Abschätzung der Siebung φ des Uropepsinogens in der Glomerulummembran der Niere nach der Theorie von PAPPENHEIMER (26) möglich. Die Größe φ, die von PAPPENHEIMER verwandt wurde, ist durch die Beziehung

$$\varphi = \frac{c_2}{c_1} \quad \text{gegeben.}$$

c_1 = Konzentration der Substanz im Blut

c_2 = Konzentration der Substanz im Ultrafiltrat.

Sie hängt in komplizierter Weise von der Gesamtoberfläche der Poren je Einheit der Weglänge durch die Membran, der Filtrationsrate, dem Diffusionskoeffizienten und dem Verhältnis des Stokes'schen Radius zum Porenradius ab. Der Stokes'sche Radius wurde aus der Diffusionskonstanten ermittelt.

PAPPENHEIMER hat die Abhängigkeit der Filtration ($\mathcal{S}$) von dem Stokes'schen Radius der Proteinmoleküle unter Berücksichtigung der anderen Parameter berechnet. In der folgenden Abbildung ist dieser Zusammenhang wiedergegeben.

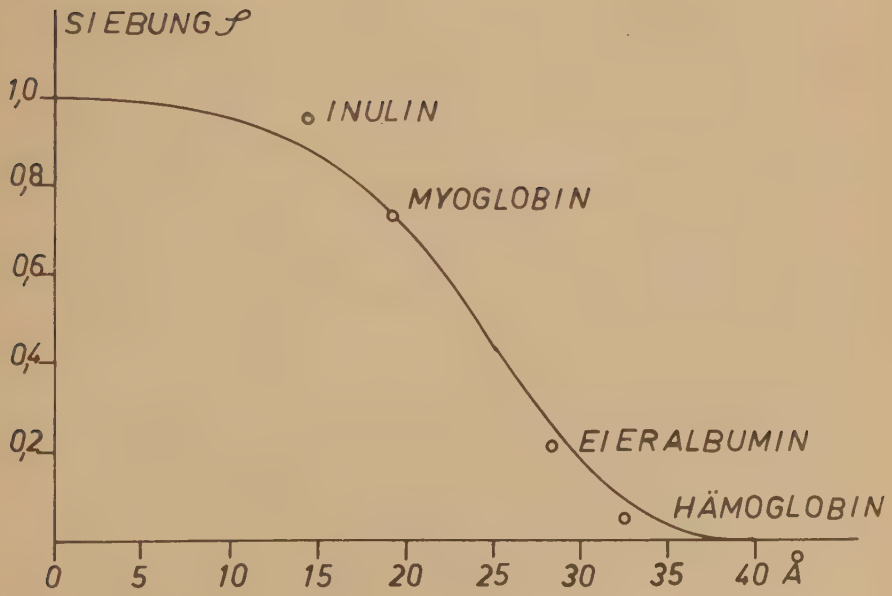

Abb. 38: Die Abhängigkeit der Siebung $\mathcal{S}$ (Ordinate) von dem Stokes'schen Radius der Proteinmoleküle (Abszisse)

Trägt man nun den Äquivalentradius des Uropepsinogens, der in der vorliegenden Arbeit aus dem Molekulargewicht ermittelt wurde, in die Abbildung 38 ein, so erhält man für die Siebung (S) den Wert 0,56. Dieser Wert gibt einen Ansatz für die Aufklärung des renalen Mechanismus der Elimination des Plasmapepsinogens (27).

F ZUSAMMENFASSUNG

1) Es wurden an den Sephadex-Gelen G 100 und G 200 Harnproteinkonzentrate aufgetrennt. Im Eluat sind an dem Gel Sephadex G 200 deutlich 2 Proteinmaxima zu erkennen. An dem Dextran-Gel G 100 überlagern sich beide Maxima. Die beiden Maxima stellen Uroglobulin und Uroalbumin dar.

2) Innerhalb dieser Eiweißverteilung wurde mit Hilfe einer automatisierten Methode die saure proteolytische Aktivität ermittelt. Sämtliche Messungen ergaben für die saure proteolytische Aktivität des Harnes einen "Peak", d.h. in der Gelchromatographie stellt sich die saure proteolytische Aktivität als eine einheitliche Fraktion dar.

3) Durch Eichen der verwendeten Gelsäulen mit globulären Proteinen bekannten Molekulargewichtes wurde versucht, den Molekulargewichtsbereich, in dem das Uropepsinogen liegt, zu erfassen. Für Sephadex G 200 ergab sich für die saure proteolytische Aktivität des Harnes ein Molekulargewichtsbereich von 36300 bis 41700 mit einem mittleren Molekulargewichtsbereich von 39000. Für Sephadex G 100 ergab sich für die saure proteolytische Aktivität des Harnes ein Molekulargewichtsbereich von 37200 bis 46700 mit einem mittleren Molekulargewicht von 41900.

4) In weiteren Untersuchungen wurde die saure proteolytische Aktivität des Magensaftes (Pepsin) auf ihr gelchromatisches Verhalten geprüft. Es ergab sich für das Sephadex-Gel G 200 ein Molekulargewichtsbereich von 28800 bis 33100 mit einem mittleren Molekulargewicht von 31000, für G 100 ein Molekulargewichtsbereich von 28000 bis 29000 mit einem mittleren Molekulargewicht von 28500.

5) Zusätzlich wurde die Verteilung der im Magensaft vorhandenen Proteine bestimmt. Es ergab sich für sämtliche Messungen ein "Peak" für die saure proteolytische Aktivität.

G LITERATUR - VERZEICHNIS

(1) v. BRÜCKE, E. — Sitzungsbericht Akd. Wissensch. Math.-naturwiss. Klasse 43, 601 (1861)

(2) BENDERSKY, J. — Virchows Arch.path. Anat. 121, 554 (1890)

(3) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L., MILLER, L.L. — Amer. J. Physiol. 245, 1099 (1963)

(4) FREIS, A., LEPPLA, W. — Klin. Wschr. 41, 1161 (1963)

(5) SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.J., MILLER, L.L. — Amer. J. Physiol. 206, 1106 - 1110 (1964)

(6) KELLER, H.E., SUTTER, H., HOFFSÜMMER, B., LEPPLA, W. — Sonderdruck 451: Automation in der Analyt. Chemie (1965) Technicon GmbH., Frankfurt

(7) WAGNER, H. — Z. Naturforsch. 12b, 514-518 (1957)

(8) STUART, H.A. — Das Makromolekül in Lösungen II, 356 (1953)

(9) SCHUBERT, G., AUERSWALD, W., DOLESCHEL, W., SCHUBERT, H. — Klin. Wschr. 43, 462 (1965)

(10) FLODIN, P. — Dextran Gels and their Application in Gel Filtration Pharmacia Uppsala (1962)

(11) PORATH, J. — J. appl. Chem. 6, 233 - 244 (1963)

(12) SQUIRE, P.G. — Arch. Biochem. 107, 471 - 478 (1964)

(13) ACKERS, G.K. — Biochemistry 3, 723-730 (1964)

(14) ANDREWS, P. — Biochem.J. 91, 222-233 (1964)

(15) WHITAKER, J.R. — Analyt. Biochem. 35, 1950 - 1953 (1963)

(16) LAURENT, T.C., KILLANDER, J. — Journal of Chromatographie 14, 317 - 330 (1964)

(17) PORATH, J., FLODIN, P. — Nature (Lond.) 183, 1657 (1959)

(18) STUART, H.A. — Das Makromolekül in Lösungen II 260 (1953)

(19) WIELAND, T., DUESBERG, P., DETERMANN, H. — Biochem. Z. 337, 303 - 311 (1963)

(20)	RENKIN, E.M.	J. gen. Physiol. 38, 225 (1955)
(21)	FAXEN, H.	Arkiv Mat. Astron. Fysik Nr. 27 (1922)
(22)	OGSTON, A.G.	Transactions of the Faraday Society 54, 1754 (1958)
(23)	LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.	J. biol. Chem. 193, 265 (1951)
(24)	LAYBE, E.	Methods in Enzymologie III, 450 (1957)
(25)	HOPPE-SEYLER, THIERFELDER	Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage III, 1, 600 (1955)
(26)	PAPPENHEIMER, J.R.	Klin. Wschr. 33, 362 (1955)
(27)	LEPPLA, W., THEISS, H., WEIDLER, A., SUTTER, H., KELLER, H.E.	p. 466 in: "Aktuelle Probleme der Nephrologie", Ed.: F. KRÜCK, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1966

Herrn Prof. Dr. med. F. DOENECKE, Direktor der 1. Medizinischen Universitätsklinik, danke ich für die Möglichkeit der Arbeit an seiner Klinik.

Herrn Privatdozent Dr. med. W. LEPPLA danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und für die Hilfe bei der Gestaltung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. H.E. KELLER spreche ich meinen aufrichtigen Dank für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit aus.

Fräulein KNABE möchte ich für die Hilfe bei den Messungen danken.

Lebenslauf

Am 28. Dezember 1942 wurde ich, Ingeborg SIEWERS, als Tochter des Dr.Ing. Hermann SIEWERS und seiner Ehefrau Herta SIEWERS geb. AST in Völklingen/Saar geboren. Nach vierjährigem Besuch der evangelischen Volksschule in Völklingen war ich ab 1952 im Staatlichen Mädchenrealgymnasium in Völklingen, wo ich Ostern 1961 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes, wo ich im Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Danach studierte ich zwei Semester an der Universität Freiburg und kehrte im Wintersemester 1964/65 an die Universität des Saarlandes zurück, um hier mein Medizinstudium zu beenden.

Am 26. Juli 1967 bestand ich das Staatsexamen.

Geschäfts-, Werbe- und Privat-Drucksachen

ROTAPRINT-OFFSET-DRUCKEREI
6602 DUDWEILER

Klein

Scheidter Straße 26 Telefon Amt Sulzbach 7 32 84

Spezialgebiet: Druck von Dissertationen